



TECHNISCHE UNIVERSITÄT  
**CAROLO-WILHELMINA**  
ZU BRAUNSCHWEIG

**Metabolomanalyse des hyperthermophilen Archaeons**  
*Sulfolobus solfataricus* unter dem Einfluss von  
Temperaturveränderungen mit Gaschromatographie-  
Massenspektrometrie

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin für Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

genehmigte  
D i s s e r t a t i o n

von Patricia Anna Wieloch  
aus Kreuzburg (Polen)

1. Referent:	Professor Dr. Dietmar Schomburg
2. Referent:	Professor Dr. Dieter Jahn
eingereicht am:	13.07.2011
mündliche Prüfung (Disputation) am:	12.07.2012

Druckjahr 2012

# Veröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

## Publikationen

Albers S.V., Birkeland N.K., Driessen A.J.M., Gertig S., Haferkamp P., Klenk H.P., Kouril T., Manica A., Pham T.K., Ruoff P., Schleper C., Schomburg D., Sharkey K.J., Siebers B., Sierocinski P., Steuer R., Van der Oost J., Westerhoff H.V., Wieloch P., Wright P.C., Zaparty M. (2009) Sulfosys (Sulfolobus Systems Biology): Towards a Silicon Cell Model for the Central Carbohydrate Metabolism of the Archaeon *Sulfolobus Solfataricus* under Temperature Variation. *Biochem Soc Trans*, **37**(1):58-64

Zaparty M., Esser D., Gertig S., Haferkamp P., Kouril T., Manica A., Pham T.K., Reimann J., Schreiber K., Sierocinski P., Teichmann D., van Wolferen M., van Jan M., Wieloch P., Albers S.V., Driessen A.J.M., Klenk H.P., Schleper C., Schomburg D., van der Oost J., Wright P.C., Siebers B. (2009) „Hot standards“ for the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Extremophiles*, **14**(1):119-142

## Präsentationen

Wieloch P., Schomburg D., Metabolome analysis of *Sulfolobus solfataricus* with gas chromatography - mass spectrometry. *SulfoSys Status Meeting, Wien, 2008*

Wieloch P., Gertig S., Schomburg D., New insights in metabolomics of *Sulfolobus solfataricus*. *SulfoSys Status Meeting, Wien, 2009*

Wieloch P., Gertig S., Schreiber K., Schomburg D., Metabolome analysis of *Sulfolobus solfataricus* - Growth under different temperatures. *SulfoSys Status Meeting, Essen, 2009*

Wieloch P., Metabolome analysis of *Sulfolobus solfataricus* under temperature variation. *SulfoSys Student Status Meeting, Duisburg, 2010*

## Poster

Wieloch P., Gertig S., Schreiber K., Schomburg D., Metabolome analysis of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *European BioPerspectives, Hannover (2008)*

Wieloch P., Gertig S., Schreiber K., Schomburg D., Metabolome analysis of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Trends in metabolomics, Frankfurt am Main (2008)*

Wieloch P., Gertig S., Schreiber K., Schomburg D., Analysis of the cellular response of the archaeon *Sulfolobus solfataricus* on the metabolome level to different growth conditions and genetic perturbation focused on central carbohydrate metabolism and its regulation. *SysMO conference, Status seminar, Bad Honnef (2008)*

Wieloch P., Schomburg D., Analysis of the cellular response of the archaeon *Sulfolobus solfataricus* on the metabolome (exometabolome) level to different growth conditions and genetic perturbation focused on central metabolism and its regulation. *SysMO conference, Status Seminar, Bad Honnef (2009)*

**In Liebe und Dankbarkeit  
Meinen Eltern**

**Wenn etwas kleiner ist als das Größte,  
so ist es darum noch lange nicht unbedeutend.**

Lucius Annaeus Seneca

# Inhaltsverzeichnis

Kurzzusammenfassung.....	V
Abstract.....	VI
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Archaeen.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Besondere Eigenschaften von hyperthermophilen Organismen.....	4
1.1.2 Abgewandelter zentraler Kohlenhydratstoffwechsel bei Archaeen.....	8
<b>1.2 Modellorganismus <i>Sulfolobus solfataricus</i>.....</b>	<b>15</b>
<b>1.3 Systembiologie.....</b>	<b>17</b>
1.3.1 Genomik.....	17
1.3.2 Transkriptomik.....	18
1.3.3 Proteomik.....	19
1.3.4 Metabolomik.....	20
<b>1.4 Methoden in der Metabolomanalyse.....</b>	<b>21</b>
1.4.1 Aufarbeitung der Proben.....	23
1.4.2 Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS).....	25
<b>1.5 Kultivierung im Bioreaktor.....</b>	<b>28</b>
<b>1.6 Ziele der Arbeit.....</b>	<b>31</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>33</b>
<b>2.1 Chemikalien, Kits, Materialien und Geräte.....</b>	<b>33</b>
<b>2.2 Software und Bibliotheken.....</b>	<b>39</b>
<b>2.3 Verwendete Organismenstämme.....</b>	<b>40</b>
<b>2.4 Medien, Puffer und Lösungen.....</b>	<b>41</b>
<b>2.5 Mikrobiologische Techniken.....</b>	<b>44</b>
2.5.1 Bestimmung der Zelldichte.....	44
2.5.2 Kultivierungsbedingungen.....	45
2.5.2.1 Lagerung von Mikroorganismen.....	44
2.5.2.2 Kultivierung im Schüttelkolben.....	45
2.5.3 Bestimmung der Biotrockenmasse.....	46
2.5.4 Berechnung der spezifischen Wachstumsrate und Verdopplungszeit.....	46

2.5.5	Quantifizierung des assimilierten Kohlenstoffs.....	48
2.5.5.1	Bestimmung der Glucosekonzentration im Medium.....	48
2.5.5.2	Korrelation von Glucoseverbrauch und Biotrockenmassezuwachs.....	49
<b>2.6</b>	<b>Kultivierung im Bioreaktor.....</b>	<b>50</b>
2.6.1	Vorbereitung und Kalibrierung des Systems.....	50
2.6.2	Fermentationsparameter.....	51
2.6.3	Fermentationsverlauf und Datenaufzeichnung.....	52
<b>2.7</b>	<b>Temperaturschock-Experimente.....</b>	<b>53</b>
2.7.1	Kälteschock.....	53
2.7.2	Hitzeschock.....	53
<b>2.8</b>	<b>Methoden für die Metabolomanalyse.....</b>	<b>54</b>
2.8.1	Aufarbeitung der Proben.....	54
2.8.2	Quenching.....	56
2.8.3	GC-MS-Analyse.....	57
2.8.3.1	Messung der Proben.....	57
2.8.3.2	Auswertung der Messdaten.....	58
2.8.3.3	Chemometrische Datenanalyse und Statistik.....	60
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>63</b>
<b>3.1</b>	<b>Etablierung der Wachstumsbedingungen und Bestimmung mikrobiologischer Parameter.....</b>	<b>63</b>
3.1.1	Kultivierung von P2 1617 bei unterschiedlichen Temperaturen.....	64
3.1.2	Korrelation von Biotrockenmasse und optischer Dichte.....	65
3.1.3	Berechnung der spezifischen Wachstumsrate und Verdopplungszeit bei 80 °C, 70 °C und 65 °C.....	65
3.1.4	Wachstumskurven von PBL 2025 und PBL 2025ΔSSO3195.....	67
3.1.5	Etablierung der Kultivierung im Bioreaktor.....	68
3.1.6	Quantifizierung des assimilierten Kohlenstoffs.....	71
<b>3.2</b>	<b>Methodenetablierung für die Metabolomanalyse.....</b>	<b>73</b>
3.2.1	Quenching.....	73
3.2.2	Etablierung der Aufarbeitungsmethode.....	76
<b>3.3</b>	<b>Metabolomanalyse von <i>Sulfolobus solfataricus</i>.....</b>	<b>79</b>
3.3.1	Charakterisierung des metabolischen Profils von Stamm P2 1617.....	79



3.3.2	Untersuchungen des Metaboloms bei Temperaturvariationen.....	82
3.3.2.1	70 °C im Vergleich zu 80 °C.....	83
3.3.2.2	65 °C im Vergleich zu 70 °C.....	89
3.3.3	Kälteschock von 80 °C auf 65 °C.....	91
3.3.4	Hitzeschock von 80 °C auf 88 °C.....	95
3.3.5	Stamm PBL 2025 und <i>knock out</i> Mutante PBL 2025ΔSSO3195.....	97
3.3.5.1	Vergleich von P2 1617 mit PBL 2025.....	98
3.3.5.2	Vergleich des PBL 2025 mit PBL 2025ΔSSO3195.....	100
3.3.5.3	PBL 2025 und PBL 2025ΔSSO3195 bei 70 °C und 80 °C.....	102
3.3.6	Unbekannte Verbindungen in <i>S. solfataricus</i> .....	108
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>110</b>
<b>4.1</b>	<b>Etablierung der Wachstumsbedingungen und Bestimmung mikrobiologischer Parameter.....</b>	<b>110</b>
4.1.1	Etablierung der Kultivierung in Schüttelkolben.....	111
4.1.2	Kultivierung des P2 1617 bei unterschiedlichen Temperaturen.....	111
4.1.3	Wachstumskurven von PBL 2025 und PBL 2025ΔSSO3195.....	112
4.1.4	Etablierung der Kultivierung im Bioreaktor.....	113
4.1.5	Quantifizierung des assimilierten Kohlenstoffs.....	117
<b>4.2</b>	<b>Methodenetablierung für die Metabolomanalyse.....</b>	<b>119</b>
<b>4.3</b>	<b>Metabolomanalyse von <i>Sulfolobus solfataricus</i>.....</b>	<b>123</b>
4.3.1	Charakterisierung des metabolischen Profils von <i>S. solfataricus</i> .....	123
4.3.1.1	Das GC-MS-Chromatogramm von <i>S. solfataricus</i> .....	123
4.3.1.2	Vergleich mit anderen Mikroorganismen.....	125
4.3.2	Untersuchungen des Metaboloms bei Temperaturvariationen.....	131
4.3.2.1	70 °C im Vergleich zu 80 °C.....	132
4.3.2.2	65 °C im Vergleich zu 70 °C.....	139
4.3.3	Kälteschock von 80 °C auf 65 °C.....	140
4.3.4	Hitzeschock von 80 °C auf 88 °C.....	144
4.3.5	Stamm PBL 2025 und <i>knock out</i> Mutante PBL 2025ΔSSO3195.....	146
4.3.5.1	Vergleich von P2 1617 mit PBL 2025.....	146
4.3.5.2	Vergleich von PBL 2025 mit PBL 2025ΔSSO3195.....	148
4.3.5.3	PBL 2025 und PBL 2025ΔSSO3195 bei 70 °C und 80 °C.....	151

4.3.6	Unbekannte Verbindungen in <i>S. solfataricus</i> .....	155
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	159
<b>6</b>	<b>AUSBLICK</b> .....	161
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	162
<b>8</b>	<b>ANHANG</b> .....	174
<b>9</b>	<b>ABKÜRZUNGEN</b> .....	209
	<b>Danksagung</b> .....	213

## Kurzzusammenfassung

Hyperthermophile Archaeen weisen viele interessante Charakteristika in ihrem Stoffwechsel auf. Dieser ist jedoch noch vergleichsweise wenig erforscht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine erste Analyse des Metaboloms des hyperthermophilen Archaeons *Sulfolobus solfataricus* durchgeführt, um eventuelle Anpassungsstrategien und Regulationsmechanismen des Organismus an die extremen Lebensbedingungen zu ergründen. Im Fokus stand dabei der zentrale Kohlenhydratstoffwechsel, der bei *S. solfataricus* einen abgewandelten Entner-Doudoroff-Weg beinhaltet. In Zusammenarbeit mit Kooperationspartnern des SulfoSys-Projekts wurden Daten mehrerer zellulärer Ebenen in einem systembiologischen Kontext vereinigt.

Nachdem die Kultivierungsbedingungen und wichtige mikrobiologische Parameter für den in der Arbeitsgruppe neuen Organismus bestimmt sowie die Aufarbeitungsprozedur für eine verlässliche Metabolomanalyse etabliert worden waren, wurde ein erstes metabolisches Profil von *S. solfataricus* generiert und zunächst qualitativ ausgewertet. Beim Vergleich von *S. solfataricus* mit mesophilen Bakterien konnten einige Unterschiede in den metabolischen Profilen detektiert werden, die möglicherweise zum Teil archaeenspezifisch oder auch einzigartig für Thermophile sind.

Quantitative Veränderungen von relativen Metabolitkonzentrationen des zentralen Kohlenhydrat- sowie des peripheren Stoffwechsels bei Temperaturen von 10 °C und 15 °C unterhalb des Optimums deuten auf spezifische Anpassungen des Organismus auf dieser Ebene hin. Die Analyse einer *knock out* Mutante mit fehlender KDG-Kinase ergab interessanterweise ähnliche Veränderungen im zentralen Kohlenhydratstoffwechsel wie der Wildtyp bei niedrigeren Temperaturen. Diese wurden mit zusätzlichem Temperatureinfluss noch verstärkt.

Es konnten weiterhin Veränderungen zwischen Proben beobachtet werden, die einem plötzlichen Kälte- und Hitzeschock ausgesetzt worden waren.

Einige unbekannte Verbindungen im GC-MS-Chromatogramm von *S. solfataricus*, die nicht in der verwendeten Stoffbibliothek hinterlegt waren, jedoch ebenfalls Veränderungen zeigten, konnten durch Vergleiche von Massenspektren und Messungen von Standards zum Teil bestimmten Stoffklassen zugewiesen werden.

## Abstract

Hyperthermophilic archaea possess some interesting modifications concerning their metabolism, which is up to now comparatively sparsely investigated. As a part of this PhD thesis, a first analysis of the metabolome of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* was realised to investigate possible regulation mechanisms and adaptation strategies to the extrem environmental conditions of the organism. The focal point of the investigation was the central carbohydrate metabolism, which contains a modified type of the Entner-Doudoroff pathway in *S. solfataricus*. In collaboration with the partners from the SulfoSys-project, data including several disciplines were investigated at the systems level.

In the beginning, it was necessary to establish the cultivation conditions and to determine important microbiological parameters for this still new organism in our group. Furthermore, the procedure for a reliable metabolome analysis had to be optimized for *S. solfataricus*. Finally, a first metabolome analysis could be generated and was followed by a qualitative interpretation. The comparison of the metabolic profiles of *S. solfataricus* and mesophilic bacteria detected some differences, which could be partly specific for archaea, whereas other changes may represent thermophilic features.

Quantitative changes of relative metabolite concentrations of central carbohydrate metabolism and peripheric pathways at a temperature of 10 °C and 15 ° below the optimum (80 °C) indicate a specific adaptation of the organism at metabolite level. Interestingly, the analysis of a knock out mutant which lacks the KDG kinase showed similar changes as the wildtype at lower temperatures within the central carbohydrate metabolism. This effect still increases under the influence of lower temperature.

Furthermore, changes in metabolite concentration could be observed between samples which had been exposed an abrupt cold and heat shock.

Some unknown compounds in the GC-MS chromatogram of *S. solfataricus*, that are not present in the used compound library, but which exhibit biological responses within the temperature experiments carried out in this work, could be divided into compound classes through comparison of mass spectra and measurement of standards.

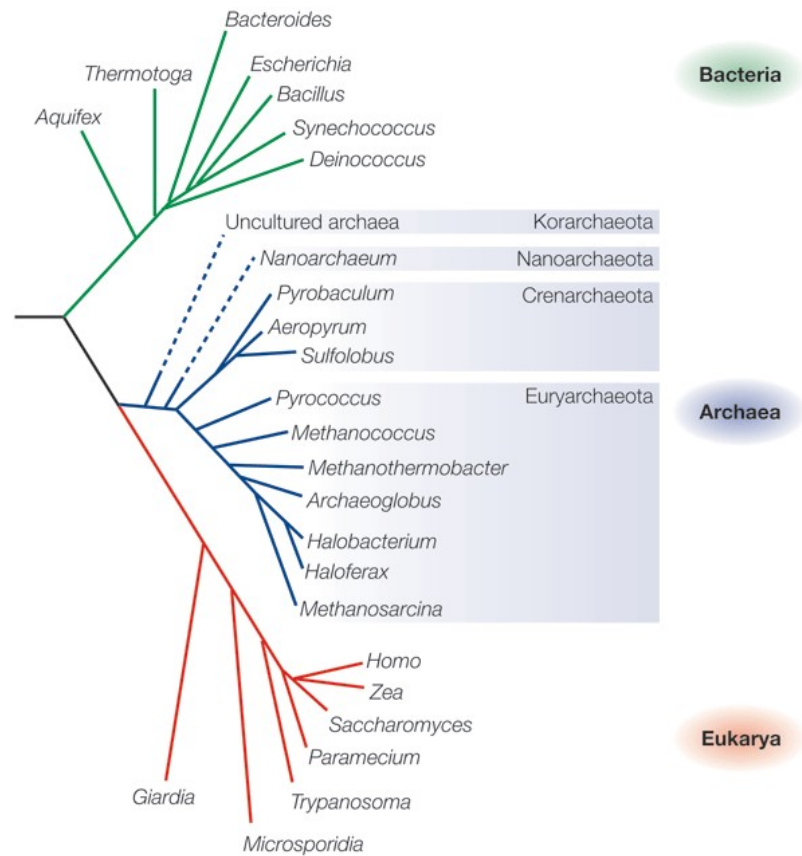
# 1 Einleitung

Um Leben in seiner Gesamtheit besser verstehen zu können, muss es mit seinen komplexen Ebenen als ein System betrachtet werden. Ein moderner Zweig der Biowissenschaften ist die Systembiologie, die vom Genom bis hin zum Metabolom alle Ebenen integriert und unter anderem das Ziel verfolgt, Leben virtuell zu simulieren. Mithilfe mathematischer Computermodelle sollen Reaktionen eines Organismus bzw. einer Zelle auf verschiedenste Umweltreize simuliert und Vorhersagen getroffen werden. Aufgrund der mittlerweile guten Zugänglichkeit zu umfangreichen genetischen Daten findet die Systembiologie bereits große Anwendung in der mikrobiologischen Forschung. Mit der Gründung der internationalen europäischen Forschungsinitiative „Systems Biology of Microorganisms“ (SysMO; <http://www.sysmo.net>) wurden 2007 11 Projekte gestartet, welche die unterschiedlichsten Mikroorganismen ins Licht der Forschung rückten. Seit ihrer Entdeckung sind Archaeen ein interessantes Forschungsgebiet, da diese Organismen Geheimnisse bergen, die dem Verständnis frühester Lebensformen auf der Erde gleichkommen. Archaeen waren bis jetzt kaum Mittelpunkt systembiologischer Untersuchungen. Das hyperthermophile Archaeon *Sulfolobus solfataricus* dient im Rahmen von SysMO sowie auch im Rahmen dieser Arbeit als Modellorganismus.

## 1.1 Archaeen

Archaeen bilden neben Eukaryoten und Bakterien die dritte Domäne des Lebens. Es sind einzellige Organismen, die weder ein Cytoskelett noch Zellorganellen besitzen. Als Fortbewegungsorgan nutzen sie relativ einfach strukturierte Flagellen. Vom Menschen lange unentdeckt, jedoch schon seit mehr als 3 Milliarden Jahren auf der Erde, zählen sie zu den Urorganismen. Entdeckt und erstmals beschrieben wurden Archaeen Ende der 70er Jahre (Woese und Fox, 1977, Woese *et al.*, 1990). Archaeen werden in die Reiche der Crenarchaeoten, Euryarchaeoten und Korarchaeoten unterteilt. Letztere gehören zu einer Gruppe bisher überwiegend unkultivierter Archaeen, da sie bisher noch nicht in Reinkultur gewonnen werden konnten (Barns *et al.*, 1996). Da Korarchaeoten im phylogenetischen Baum der Archaeen sehr früh an der Wurzel abzweigen (**Abb. 1**), könnten sie für das Verständnis sehr früher Lebensformen auf der Erde von großer Bedeutung sein. Ein

weiterer Zweig, die sog. Nanoarchaeota, wurde erst vor Kurzem entdeckt (Huber et al., 2002).

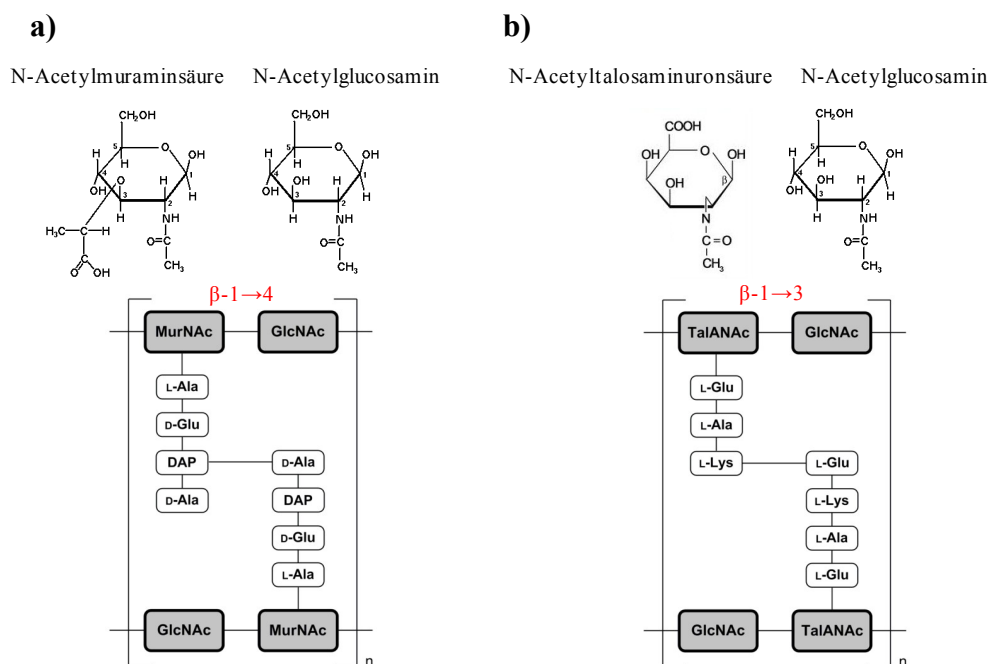


**Abb. 1** Phylogenetischer Stammbaum des Lebens, basierend auf 16S rRNA Sequenzanalysen (Allers und Mevarech, 2005).

Aufgrund fehlender molekularbiologischer Möglichkeiten wurden Archaeen, bevor sie phylogenetisch klassifiziert werden konnten, irrtümlich in die Domäne der Bakterien eingeordnet. Mikrobiologen nutzten damals hauptsächlich vergleichende Analysen des Phänotyps zur evolutiven Einordnung von Mikroorganismen. Erst mithilfe von vergleichenden Analysen von 16S rRNA-Sequenzen konnte die dritte Domäne phylogenetisch von Eukaryoten und Bakterien abgegrenzt werden (Woese et al., 1990). Vermutlich stehen Archaeen den Eukaryoten phylogenetisch sogar näher als Bakterien. Bakterielle Eigenschaften sind z.B. die Zellgröße, das Fehlen von Kompartimenten und Zellkern, die Art der Zellteilung und die ringförmige DNA. Dagegen sind molekulare Vorgänge wie Transkription und Translation denjenigen der Eukaryoten sehr ähnlich.

Archaeen besitzen komplexe RNA-Polymerasen und bei der Transkription konnte die sonst nur in Eukaryoten vorkommende TATA-Box nachgewiesen werden (Madigan et al., 2009). Trotz dieser gemeinsamen Merkmale weisen Archaeen eine enorme phänotypische Vielfalt und zahlreiche archaeen-spezifische Merkmale, sowohl auf molekularer, als auch auf biochemischer Ebene, auf. Zwei Drittel der Gene in Archaeen besitzen keine Homologe in Bakterien und Eukaryoten (Madigan et al., 2009). Die Zellwand und Zellmembran haben eine völlig andere Struktur als bei den anderen beiden Domänen (Nicolaus et al., 1990, Veith et al., 2009), wobei sie auch innerhalb der Archaeen selbst in unterschiedlichsten Formen auftreten können. Einige Arten sind zellwandlos, andere weisen wiederum komplexe, mehrschichtige Zellwände auf. Bisher wurde bei allen Archaeen eine Resistenz gegenüber Antibiotika festgestellt (Madigan et al., 2009).

Ein wichtiger Baustein ist das Pseudopeptidoglycan (Pseudomurein) anstelle des in Bakterien vorkommenden Mureins (**Abb. 2**). Im Gegensatz zur N-Acetylmuraminsäure bei Bakterien liegt bei Archaeen N-Acetylglucosamin vor, die eine  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 3 glykosidische Bindung mit N-Acetylglucosamin eingeht, anstatt der  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-Bindung, die bei Bakterien vorkommt. Die  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 3 kann nicht durch Lysozyme gespalten werden. Zudem kommen im Pseudomurein keine D-Aminosäuren vor.



**Abb. 2** Peptidoglycan (**a**) und Pseudopeptidoglycan (**b**)

Archaeen gedeihen in allen terrestrischen und marinen Umgebungen der Erde, doch ein besonderes Kennzeichen dieser Domäne ist ihr breites Vorkommen in eher lebensfeindlichen Biotopen. Viele Arten überleben sehr hohe Temperaturen von über 100 °C, sehr kalte Temperaturen um 0 °C, niedrige pH-Werte (1-5) oder extrem salzhaltige Umgebungen (> 30 % Salzgehalt (w/v)). Die ungewöhnlichen Lebensorte gaben diesen Organismen den Namen „Extremophile“. Isoliert wurden sie z.B. aus vulkanischen Gebieten, sog. „Black smokers“ in der Tiefsee, heißen Quellen und Geysiren, antarktischen Gewässern, dem Toten Meer, aber auch aus dem Darmtrakt von Tieren und Menschen (symbiontische Lebensformen) (Madigan et al., 2009). Zum Reich der Crenarchaeaoten gehören neben psychrophilen (kälteliebenden) überwiegend hyperthermophile und thermoacidophile Arten, während unter den Euryarchaeaoten sowohl hyperthermophile als auch halophile und methanogene Arten vertreten sind. Pathogenität ist im Reich der Archaeen bisher nicht bekannt. Der Stoffwechsel ist sehr vielfältig und erstreckt sich von autotrophem und heterotrophem, anaerobem und aerobem Wachstum bis hin zur Nutzung von Lichtenergie. Es gibt chemoorganotrophe und chemolithotrophe, methanproduzierende und schwefelreduzierende Arten. Archaeen sind mittlerweile recht gut erforscht, 96 Genome aus fast allen taxonomischen Klassen sind verfügbar (<http://archaea.ucsc.edu/genomes/archaea/>). Dennoch ist das Verständnis vieler biochemischer und physiologischer Vorgänge in Archaeen nur gering im Vergleich zu Bakterien und Eukaryoten.

### 1.1.1 Besondere Eigenschaften von hyperthermophilen Organismen

Leben auf der Erde findet überwiegend bei gemäßigten Temperaturen zwischen 25 °C und 40 °C statt. Bei Temperaturen über 40 °C denaturieren die meisten Proteine, Membranen schmelzen und ab einer Temperatur von 80 °C denaturiert DNA. Leben bei hohen Temperaturen erfordert eine sehr effiziente Anpassung des Organismus. Organismen, die bei 80 °C und höheren Werten ihr Temperaturoptimum haben, zählen zu den Hyperthermophilen. Diese Lebensweise beschränkt sich ausschließlich auf Mikroorganismen, wobei bisher keine thermophilen eukaryotischen und auch nur wenige prokaryotische Mikroorganismen gefunden wurden. Die meisten Vertreter unter den Hyperthermophilen sind Archaeen. Der derzeit hyperthermophilste bekannte Organismus ist *Methanopyrus kandleri*, Stamm 116, dessen Temperaturoptimum bei 122 °C liegt (Takai



et al., 2008). Die Voraussetzung für diese Lebensweise ist, dass alle Superstrukturen einer Zelle stabilisiert bzw. aktiv bleiben. Um das zu gewährleisten, weisen Hyperthermophile eine Reihe von speziellen Anpassungen auf.

### **Nukleinsäuren**

Die DNA-Stränge von Hyperthermophilen liegen in zirkulärer anstatt linearer Form vor und erhöhen damit ihre Hitzetoleranz bis auf 107 °C (Grogan, 1998). Zusätzlich trägt positives *Supercoiling* der DNA, hervorgerufen durch die bei Hyperthermophilen einzigartigen reversen Gyrase, zur Hitzestabilität bei. Die reverse Gyrase ist eine ATP-abhängige Topoisomerase und kommt neben der gewöhnlichen Topoisomerase, die das weit verbreitete negative *Supercoiling* induziert, in allen hyperthermophilen Organismen vor.

Eine weitere strukturstabilisierende Eigenschaft sind kleine basische Proteine, die DNA-Bindungen eingehen und dadurch die Schmelztemperatur erhöhen. Diese Proteine weisen starke Ähnlichkeiten zu den in Eukaryoten vorkommenden Histonen auf, in Euryarchaeen wurden sogar echte Homologe nachgewiesen (Charlier und Droogmans, 2005). Verstärkte Stabilisierung der DNA durch chemische Verbindungen gilt ebenfalls als erwiesen (Daniel und Cowan, 2000). In vielen Hyperthermophilen konnten hohe Konzentrationen von sog. kompatiblen Soluten wie z.B. Kalium-di-inositol-1,1'-phosphat und Di-Glycerolphosphat (Martins et., 1997), oder hohe Polyaminkonzentrationen (Higashibata et al., 2000, Terui et al., 2005) detektiert werden. Diese meist kationischen Verbindungen stabilisieren die negativen Ladungen der DNA. Kompatible Solute üben neben dem Einfluss auf DNA auch eine stabilisierende Wirkung auf RNA und Proteine aus. Aufgrund der nachweislich erhöhten Rate der DNA-Schädigungen bei Hitze wird vermutet, dass in Thermophilen ein sehr effizientes Reparatursystem vorliegt (Robb et al., 2008), zumal die Mutationsraten in Hyperthermophilen nicht wesentlich höher sind als in Mesophilen. Neben einigen Homologien zu mesophilen Organismen ist dazu bisher nicht viel bekannt.

Ein höherer G-C-Gehalt, der generell mit der Schmelztemperatur korreliert, konnte für die DNA von Hyperthermophilen nicht belegt werden. In Teilabschnitten langlebiger RNA, wie rRNA und tRNA, wurde jedoch ein solcher Zusammenhang festgestellt (Galtier und Lobry, 1997). rRNA wird außerdem durch posttranskriptionale Modifikationen, welche bei Hyperthermophilen ein ungewöhnlich hohes Ausmaß annehmen - häufig sind dies

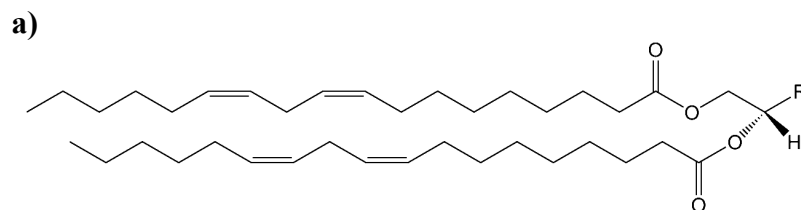
Methylierungen - vor Hitzeschädigungen geschützt (Noon et al., 1998).

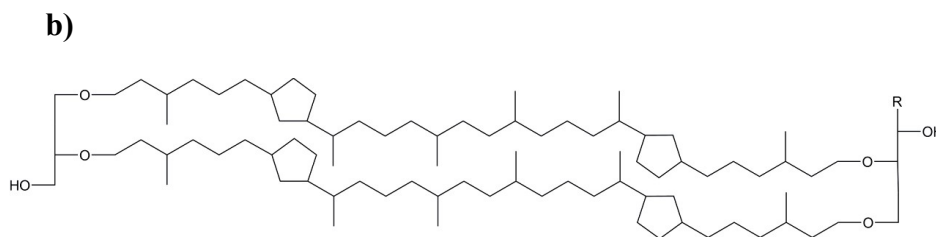
### Proteine

Zur Thermostabilität von Proteinen tragen ebenfalls mehrere Faktoren bei. Auf struktureller Ebene besitzen Proteine aus Hyperthermophilen einen höheren Anteil an hydrophoben Aminosäuren im Proteinkern und mehr geladene Aminosäuren in der Peripherie als ihre Homologen in mesophilen Organismen (Daniel und Cowan, 2000). Dies führt zu einem kompakteren, zum Teil stärker komprimierten Protein. Zudem sind auch Disulfid-Brücken, verkürzte äußere Schleifen oder ein erhöhter Prolin-Anteil in  $\beta$ -Turns ein Mittel zur Proteinstabilisierung (Charlier und Droogmans, 2005). Weiterhin unterstützen Chaperonine (sog. Hitzeschock-Proteine) die Proteine bei der Faltung. Eine hitzestabile Variante dieser Enzyme, das sog. Thermosom, wird in hyperthermophilen Organismen zum Teil in großem Ausmaß produziert (Madigan et al., 2009).

### Zellmembran

Weiterhin ist eine strukturelle Anpassung der Zellmembran für das Überleben bei hohen Umgebungstemperaturen essentiell. Die Membranen von hyperthermophilen - aber auch mesophilen - Archaeen bestehen nicht aus den üblicherweise vorkommenden doppelschichtigen Glycerinestern, sondern aus chemisch stabileren Glycerinethern (**Abb. 3**). Ungesättigte Fettsäuren werden durch gesättigte Isoprenoide ersetzt (Charlier und Droogmans, 2005). Viele hyperthermophile Archaeen weisen besonders hitzestabile, einschichtige Dibiphytanyldiglycerol-Tetraether, sog. Caldarchaeole, auf (**Abb. 3b**). Die Bildung von Cyclopentanringen innerhalb der Etherketten führt zu einer Herabsetzung der Membranfluidität und Erhöhung der Integrität bei steigender Temperatur (Gabriel und Lee Gau Chong, 2000). Obwohl sich Archaeen im Aufbau ihrer Zellwände und Zellmembranen von Bakterien und Eukaryoten unterscheiden, weisen hyperthermophile Bakterien ebenfalls die archaeen-typischen Etherlipidmembranen auf (Charlier und Droogmans, 2005).





**Abb. 3** Esterlipidmembran mit ungesättigten Fettsäuren **(a)** und Dibiphytanyldiglycerol-Tetraether (Caldarchaeol) mit Cyclopentanringen **(b)** (Charlier und Droogmans, 2005)

### Metabolismus

Auch im Metabolismus von hyperthermophilen Organismen muss es zahlreiche Modifikationen und effiziente Anpassungen geben, besonders im Hinblick auf Verbindungen, deren Dissoziationsgrad bei hohen Temperaturen steigt (z.B. ATP, NAD(P)). Es werden Strategien diskutiert wie z.B. Schutz durch Mikroumgebung, indem die Dissoziation von thermolabilen Verbindungen durch lokale Änderungen der Ionenkonzentration oder des pH-Werts verringert wird. Beim *substrate channeling* werden Metabolite über Reaktionsketten von einem Enzym zum Nächsten weitergereicht, ohne in Lösung gehen zu müssen (Daniel und Cowan, 2000). Weiterhin können Stoffwechselwege mit thermolabilen Intermediaten umgangen werden, wie z.B. im Zentralstoffwechsel von *S. solfataricus* (siehe 1.1.2). Häufig gibt es auch Modifikationen innerhalb der Cofaktoren von Hyperthermophilen. So wird NAD(P) in thermophilen Organismen oft durch das hitzestabilere Ferredoxin ersetzt (Selig et al., 1997). Außerdem wurde beobachtet, dass in einigen hyperthermophilen Archaeen ADP-abhängige Kinasen statt der üblichen ATP-Kinasen vorkommen (Daniel und Cowan, 2000).

Es wird vermutet, dass Hyperthermophile zu den ursprünglichsten Lebensformen auf der Erde zählen. Diese Hypothese wird durch die recht frühe Abzweigung der Crenarchaeoten im phylogenetischen Baum (**Abb. 1**) gefestigt. Unser Leben ist vermutlich unter Bedingungen entstanden, wie sie heute noch in den Lebensräumen der hyperthermophilen Organismen vorherrschen (Schönheit und Schäfer, 1995). Der Metabolismus von Hyperthermophilen könnte somit eine sehr frühe Phase der Evolution widerspiegeln und wichtige Hinweise zur Entwicklung von Enzymen und Stoffwechselwegen liefern.

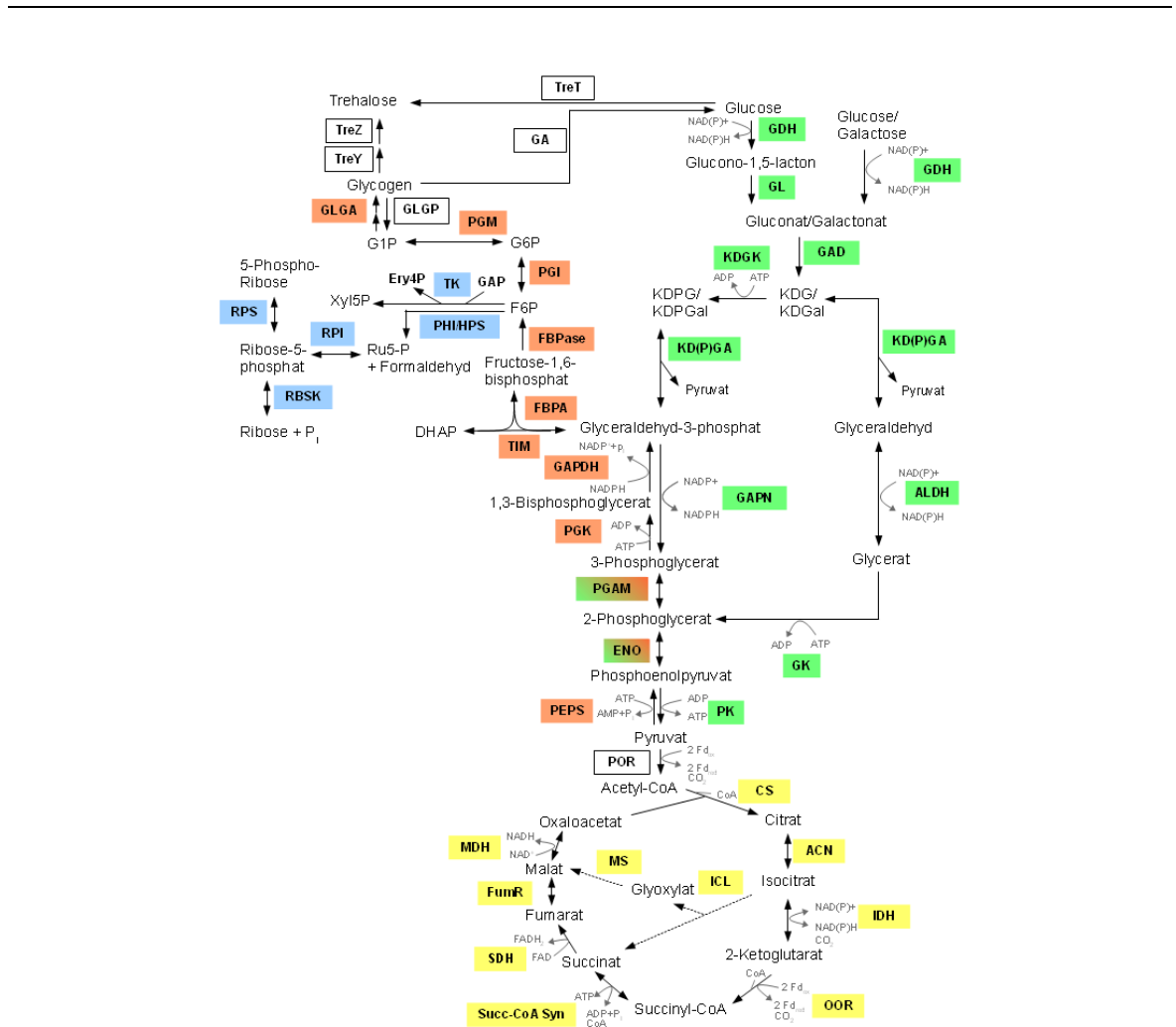
Die Frage nach der oberen Temperaturgrenze für das Leben ist noch nicht abschließend geklärt. Aufgrund der chemischen Konstruktion einiger vorherrschender Strukturen in der

Zelle, wie z.B. thermosensitiver Aminosäuren und Peptidbindungen, wird jedoch kein Leben bei über 150 °C erwartet (Charlier und Droogmans, 2005).

### 1.1.2 Abgewandelter zentraler Kohlenhydratstoffwechsel bei Archaeen

Archaeen verfügen über zentrale Stoffwechselwege, die im Vergleich zu den klassischen Stoffwechselwegen bei Bakterien und Eukaryoten viele einzigartige Besonderheiten aufweisen (Verhees et al., 2003). Zahlreiche bislang unbekannte Enzyme und Enzymfamilien wurden entdeckt und charakterisiert (Siebers und Schönheit, 2005). Viele Studien belegen, dass anaerobe Archaeen überwiegend eine modifizierte Art des Embden-Meyerhof-Parnas-(EMP)-Weges zum Abbau von Kohlenhydraten nutzen, während in aeroben Archaeen meistens Abwandlungen des Entner-Doudoroff-(ED)-Weges identifiziert wurden (Verhees et al., 2003, Selig et al., 1997, Schönheit und Schäfer, 1995). Einzig bei dem hyperthermophilen und anaeroben Archaeon *Thermoproteus tenax* wurden sowohl modifizierte Formen des EMP- als auch des ED-Weges im Zentralstoffwechsel nachgewiesen (Siebers und Schönheit, 2005). *Sulfolobus solfataricus* besitzt einen modifizierten, verzweigten Entner-Doudoroff-Weg, auf dem Glucose über einen nicht-phosphorylierenden (De Rosa et al., 1984) und einen semi-phosphorylierenden Weg (Ahmed et al., 2005) abgebaut wird (**Abb. 4**).

Bei beiden ED-Varianten wird Glucose zunächst innerhalb des gemeinsamen Zweigs entweder mittels Glucosedehydrogenase (GDH) zu Glucono-lacton umgesetzt, welches daraufhin spontan oder enzymatisch durch Gluconolactonase zu Gluconat umgewandelt wird oder die GDH katalysiert die direkte Umwandlung von Glucose zu Gluconat. Anschließend katalysiert Gluconatdehydratase die Dehydrierung von Gluconat zu 2-Keto-3-deoxygluconat (KDG). Im nicht-phosphorylierenden Zweig wird KDG durch die KD(P)G-Aldolase in Glyceraldehyd und Pyruvat gespalten. Die Glyceraldehyd-Dehydrogenase bzw. die Glyceraldehyd-Oxidoreduktase oxidiert dann Glyceraldehyd zu Glycerat. Eine Phosphorylierung findet erst auf der Stufe von Glycerat statt, welches mittels Glyceratkinase in 2-Phosphoglycerat umgesetzt wird. 2-Phosphoglycerat wird dann über Enolase und Pyruvatkinase zu Pyruvat verstoffwechselt. KDG ist das charakteristische Intermediat des nicht-phosphorylierenden ED-Weges. Erst neuesten Erkenntnissen zufolge verläuft der Glucoseabbau bei *S. solfataricus* parallel auch über einen semi-phosphorylierenden Zweig des ED-Weges (Ahmed et al., 2005).



Zaparty et al., 2009 (modifiziert)

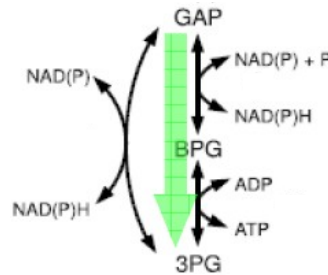
**Abb. 4 Zentralstoffwechsel von *S. solfataricus***, bestehend aus dem katabolischen verzweigten ED-Weg (grün), dem glykolytischen EMP-Weg und Glykolyse (rot), dem Zitronensäurezyklus (gelb) und dem Pentosephosphat-Weg (blau). Abkürzungen: **ACN** Aconitase; **ALDH** Glyceraldehyd-Dehydrogenase; **CS** Citratsynthase; **DHAP** Dihydroxyacetonphosphat; **ENO** Enolase; **Ery4P** Erythrose-4-phosphat; **FBPA** Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase; **FBPase** Fructose-1,6-bisphosphatase; **F6P** Fructose-6-phosphat; **FumR** Fumarat-Hydratase; **GA** Glucan-1,4- $\alpha$ -glucosidase; **GAD** Gluconat-Dehydratase; **GAP** Glyceraldehyd-3-phosphat; **GAPDH** Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; **GAPN** nichtphosphorylierende Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; **GDH** Glucose-dehydrogenase; **GK** Glyceratkinase; **GL** Gluconolaktase; **GLGA** Glykogen Synthase; **GLGP** Glykogen Phosphorylase; **G1P** Glucose-1-phosphat; **G6P** Glucose-6-phosphat; **ICL** Isocitrat-Lyase; **IDH** Isocitrat-Dehydrogenase; **KDG** 2-Keto-3-deoxygluconat **KDGal** 2-Keto-3-deoxygalactonat **KDGK** KDG-Kinase; **KDPG** 2-Keto-3-deoxy-(6-phospho)-gluconat **KD(P)GA** KD(P)G-Aldolase; **KDPGal** 2-Keto-3-deoxy-(6-phospho)-galactonat **MDH** Malat-Dehydrogenase; **OOR**  $\alpha$ -Oxoglutarat-ferredoxin-oxidoreductase; **PEPS** Phosphoenolpyruvat-Synthetase; **PGAM** Phosphoglycerat-Mutase; **PGI** Glucose-6-phosphat-Isomerase; **PGK** Phosphoglycerat-Kinase; **PGM** Phosphoglucomutase; **PHI/HPS** 3-Hexulose-6-phosphat-Isomerase/3-Hexulose-6-phosphat-Synthase; **PK** Pyruvatkinase; **POR** Pyruvatsynthase; **PRS** Ribosephosphat-Pyrophosphokinase; **RBSK** Ribosekinase; **RPI** Ribulose-5-phosphat-Isomerase; **Ru5P** Ribulose-5-phosphat; **SDH** Succinat-Dehydrogenase; **Succ-CoA Syn** Succinyl-coenzym A-Synthetase; **TIM** Triosephosphat-Isomerase; **TK** Transketolase; **TreT** Trehalose glycosylübertragende Synthase; **TreY** Maltooligosyltrehalose synthase; **TreZ** Trehalose glycosylübertragende Synthase; **Xyl5P** Xylulose-5-phosphat

Dieser Stoffwechselweg wurde schon früh für halophile Archaeen beschrieben (Tomlinson et al., 1974), galt aber lange Zeit nicht für andere Arten. Vergleichende Genomanalysen prognostizieren jedoch die Co-Existenz beider ED-Zweige bei allen Archaeen, welche den ED-Weg nutzen, darunter auch hyperthermophile Archaeen wie *Thermoproteus tenax*, *Sulfolobus tokodaii* und *S. solfataricus*. Mittels Proteinexpression und enzymatischer Analysen konnten beide Wege in *T. tenax* (Siebers et al., 2004) und *S. solfataricus* (Ahmed et al., 2005) bestätigt werden. Mithilfe computergestützter Flussanalysen konnte vor Kurzem bestätigt werden, dass in *S. solfataricus* beide ED-Wege für eine optimal berechnete Biomasseproduktion genutzt werden (Ulas et al., unveröffentlicht).

Im semi-phosphorylierenden ED-Weg erfolgt der Phosphorylierungsschritt bereits auf der Ebene von KDG mittels KDG-Kinase. Daraus folgt das Intermediat 2-Keto-3-deoxy-(6-phospho)-gluconat (KDPG). KDPG wird über die KD(P)G-Aldolase, welche auch im nicht-phosphorylierenden Zweig aktiv ist, in Glyceraldehyd-3-phosphat (GAP) und Pyruvat gespalten. Die KD(P)G-Aldolase ist ein Schlüsselenzym in diesem verzweigten ED-Weg. Mit ihren bifunktionalen Eigenschaften ist sie in der Lage, sowohl phosphorylierte als auch nicht-phosphorylierte Substrate umzusetzen. Der weitere Weg von GAP in katabolischer Richtung verläuft über den unteren EMP-Weg. Doch auch in diesem Abschnitt gibt es Eigenheiten, welche fast ausschließlich in hyperthermophilen Archaeen vorkommen. In *S. solfataricus* wurden zwei Enzyme identifiziert, die GAP verstoffwechseln können: die klassische phosphorylierende GAP-Dehydrogenase (GAPDH) und die nicht-phosphorylierende NAD(P)<sup>+</sup>-abhängige GAP-Dehydrogenase (GAPN) (Ettema et al., 2008). Während GAPDH zusammen mit der Phosphoglyceratkinase (PGK) die reversiblen Reaktionen von GAP über das Intermediat 1,3-Bisphosphoglycerat zu 3-Phosphoglycerat katalysieren, setzt GAPN GAP direkt in 3-Phosphoglycerat um (**Abb. 5**). Dabei wird die Bildung eines ATP umgangen, das beim Weg über GAPDH und PGK durch Substratkettenphosphorylierung entsteht. 3-Phosphoglycerat wird dann weiter über 2-Phosphoglycerat und Phosphoenolpyruvat (PEP) zu Pyruvat verstoffwechselt.

Ähnliche Charakteristika wie GAPN zeigt auch die ferredoxin-abhängige Glyceraldehyd-3-phosphat-Oxidoreduktase (GAPOR), welche in dem hyperthermophilen Archaeon *Pyrococcus furiosus* identifiziert wurde (van der Oost et al., 1998). Auch hier findet eine Umgehung der reversiblen Reaktionen von GAP über 1,3-Bisphosphoglycerat zu 3-

Phosphoglycerat statt. Die direkte Oxidation von GAP zu 3-Phosphoglycerat mittels GAPN bzw. GAPOR ist irreversibel und findet ausschließlich in katabolischer Richtung statt. GAPDH und PGK haben somit höchstwahrscheinlich ihre einzige Funktion in der Gluconeogenese (Ahmed et al., 2005).



**Abb. 5** GAPN-Bypass (Siebers, 2009).

Die evolutive Entstehung des Enzyms GAPN steht offenbar in Zusammenhang mit der hohen Umgebungstemperatur. Phylogenetische Analysen zeigten eine verstärkte Ausbreitung des Enzyms in hyperthermophilen Archaeen, was auf eine Funktion in der Thermoadaptation hindeutet. Studien haben außerdem bewiesen, dass die katalytische Aktivität von GAPN mit der Temperatur steigt und bei *S. solfataricus* sogar auf Hitzeschock-Niveau bei 88 °C höher ist als bei optimalen 80 °C (Siebers, unveröffentlicht). Einige der Intermediate des semi-phosphorylierenden ED-Weges weisen eine auffällige Labilität gegenüber Hitze auf. GAP besitzt eine Lebensdauer von 14,5 min, 1,3-Bisphosphoglycerat nur 1,6 min bei 60 °C (Ahmed et al., 2003). Diese Thermolabilität von Intermediaten scheint der Grund zu sein, weshalb Thermoadaptation stattfinden könnte. Diese Verbindungen bilden den sog. „Flaschenhals“ des Stoffwechselweges, der eine Regulation notwendig macht. Es wird vermutet, dass der semi-phosphorylierende ED-Weg in katabolischer Richtung aufgrund eines schnellen Zerfalls von 1,3-BP einem sinnlosen Kreislauf zwischen 1,3-BP und 3-Phosphoglycerat ausgesetzt werden und der Organismus Energie in Form von ATP verlieren würde (Siebers, 2009).

Während im semi-phosphorylierenden ED-Weg durch den GAPN-Bypass das thermolabile 1,3-Bisphosphoglycerat übersprungen wird, umgeht der nicht-phosphorylierende Weg mitunter das ebenfalls thermolabile GAP. Es wird vermutet, dass der nicht-phosphorylierende Weg bei höheren Temperaturen von Bedeutung sein könnte.

Zur Zeit kann über die physiologische Rolle der Parallelität beider Stoffwechselwege nur spekuliert werden. Über Regulationsmechanismen des ED-Weges auf genetischer sowie auf Proteinebene ist nur sehr wenig bekannt (Ahmed et al., 2003). Die Lage des für GAPN codierenden Gens auf dem ED-Gen-Cluster neben der Gene für KDG-Kinase, KDG-Aldolase und Glucan-1,4- $\alpha$ -glucosidase lässt eine regulierende Funktion des semi-phosphorylierenden Zweigs vermuten. Tatsächlich konnten GAPN als einzigem Enzym des verzweigten ED-Weges allosterische Eigenschaften zugeordnet werden. Es wird durch das in der Gluconeogenese gebildete Glucose-1-phosphat allosterisch gehemmt (Ettema et al., 2008). Bekräftigt wird diese Hypothese durch vorangegangene Untersuchungen der GAPN bei *T. tenax*, wo ebenfalls allosterische Eigenschaften des Enzyms beschrieben wurden (Brunner et al., 1998).

Bei *T. tenax* wird vermutet, dass der Energiebedarf der Zelle eine Rolle bei der Aktivierung einer der Stoffwechselwegvarianten spielt (Ahmed et al., 2005). Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass der anaerobe Organismus *T. tenax* neben dem verzweigten ED-Weg auch den EMP-Weg nutzen kann und somit in katabolischer Richtung ATP generieren kann, während bei *S. solfataricus* der ATP-Gewinn im ED-Weg netto gleich null ist. Somit gibt es hier wahrscheinlich andere Gründe für die Präferenz eines der Wege.

Eine weitere spezifische Eigenschaft im Stoffwechsel von Archaeen ist der Elektronenakzeptor Ferredoxin, der anstelle des in Bakterien und Eukaryoten vorkommenden Koenzyms NADH existiert (She et al., 2001). Daneben kommt im ED-Weg ausschließlich NADP(H) als Reduktionsäquivalent vor.

Die Energiebilanz des Glucoseabbaus bis zum Intermediat Pyruvat ist - aufgrund der Umgehung von 1,3-BPG - mit null ATP netto in *S. solfataricus* schlechter als bei den meisten anderen Mikroorganismen. Die Anpassung an die hohe Temperatur hat auf Kosten von Energie stattgefunden. Der aerobe Organismus kann aber an anderen Stellen, wie z.B. im Zitronensäurezyklus und in der Atmungskette, seinen Energiebedarf decken. Es muss außerdem berücksichtigt werden, dass *S. solfataricus* im ED-Weg bei der Umsetzung von Glucose zu Gluconat insgesamt ein Reduktionsäquivalent mehr generiert als ein Organismus mit der klassischen Glycolyse und damit zusätzlich ATP gewinnt. Im Zitronensäurezyklus ist der Gewinn an Reduktionsäquivalenten und ATP bzw. GTP wie bei anderen Organismen. Bei der oxidativen Phosphorylierung generiert *S. solfataricus* wiederum weniger ATP pro Sauerstoffmolekül als z.B. *E. coli*. Aufgrund der fehlenden



NADH-Dehydrogenase (Komplex I) kann lediglich ein schwächerer elektrochemischer Gradient aufgebaut werden, woraus eine Ausbeute von  $\frac{1}{2}$  ATP pro Sauerstoffatom, im Gegensatz zu *E. coli* mit 1,5 ATP pro Sauerstoffatom, resultiert (Ulas et al., unveröffentlicht). Das vergleichsweise langsame Wachstum von *S. solfataricus* untermauert die Hypothese, dass der Organismus in seiner extremen Umgebung „Kompromisse“ eingehen und auf Kosten von Energie spezifische Anpassungen durchführen muss.

Die Glucoseaufnahme in *S. solfataricus* erfolgt nicht über das in Bakterien verbreitete Phosphotransferase-System (PTS), sondern über primären aktiven Transport. Proteinbindende, ATP-abhängige ABC-Transporter wurden neben Glucose für verschiedene Saccharide, wie Trehalose, Cellobiose, Maltose, Maltotriose und Arabinose, identifiziert (Albers et al., 1999, Elfenrink et al., 2001). Folglich sind auch die Abbauwege an diese Substratvielfalt angepasst. Der verzweigte ED-Weg in *S. solfataricus* ist nicht stereoselektiv und kann sowohl Glucose als auch Galactose verstoffwechseln (Lamble et al., 2003, Lamble et al., 2005, Ahmed et al., 2005). Kinetischen Untersuchungen zufolge besitzen einige der Enzyme eine hohe katalytische Effizienz sowohl für beide Isomerformen, wie z.B. die Glucosedehydrogenase, Gluconat-Dehydratase, KD(P)G-Aldolase und KDG-Kinase. Die Glucosedehydrogenase weist neben Glucose und Galactose Affinitäten zu einer ganzen Reihe von Aldosen auf, sowohl Hexosen als auch Pentosen. *S. solfataricus* kann außerdem Disaccharide verwerten, die diese beiden Zucker enthalten, wie z. B. Cellobiose und Lactose. Dem Enzym  $\beta$ -Glucosidase fehlt ebenfalls die spezifische Selektivität und es spaltet sowohl  $\beta$ -verknüpfte Glucosezucker (Cellobiose) und  $\beta$ -verknüpfte Glucose- und Galactose-Verbindungen (Lactose). Die meisten anderen Organismen besitzen separate Enzyme für den Abbau von Galactose. Unklar ist, ob diese fehlende Spezifität im Zentralstoffwechsel eine frühe Phase der Evolution demonstriert und neue Enzyme sich erst später entwickelten oder ob es eine Adaptation an die lebensfeindliche und teilweise nährstoffarme Umgebung des Organismus darstellt (Lamble et al., 2003).

Die Oxidation von Pyruvat verläuft bei allen Hyperthermophilen über die Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase. Beim aeroben *S. solfataricus* wird AcetylCoA vollständig zu  $\text{CO}_2$  mit  $\text{O}_2$  als Elektronenakzeptor oxidiert. Alle Enzyme des Zitronensäurezyklus sind vollständig vorhanden, einschließlich des Glyoxylat-Weges (She et al., 2001).

Dieser ist üblicherweise bei Wachstum auf Acetat aktiv, in *S. solfataricus* scheint er jedoch auch unter saccharolytischen Bedingungen aktiviert zu werden (Snijders et al., 2006).

*S. solfataricus* speichert Glucose in Form von Glycogen (König et al., 1982). Dieser Vorgang setzt Gluconeogenese voraus, die sehr wahrscheinlich über den rückwärtsgerichteten EMP-Weg abläuft. Die für die katabolischen Reaktionen notwendigen Enzyme des EMP, wie z.B. Glucokinase, Hexokinase oder Phosphofructokinase, fehlen in *S. solfataricus*, womit ein katabolischer EMP-Weg für diesen Organismus ausgeschlossen werden kann. Würde die Gluconeogenese über einen rückwärtsgerichteten ED-Weg ablaufen, würden aufgrund der fehlenden Selektivität der KDG-Aldolase neben Glucose auch Galactose bzw. andere Isomerformen entstehen.

In *S. solfataricus* verläuft der anabolische Weg ab dem Intermediat GAP weiter über Fructose-1,6-bisphosphat (analog über Dihydroxyacetonphosphat), Fructose-6-phosphat, Glucose-6-phosphat und Glucose-1-phosphat. Die beteiligten Enzyme sind Triosephosphatisomerase, Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase, Fructose-1,6-bisphosphatase, Glucose-6-phosphat-Isomerase und Phosphoglucomutase. Die Glycogensynthase katalysiert schließlich über UDP-Glucose die Polymerisation von Glucosemolekülen in  $\alpha$ -1,4-glycosidische Bindung. Die Glucan-1,4- $\alpha$ -glucosidase spaltet Glycogenketten und entlässt freie Glucose-Moleküle. Ebenso spaltet und phosphoryliert Glycogen-Phosphorylase die Glucose-Ketten, so dass Glucose-1-phosphat gebildet wird.

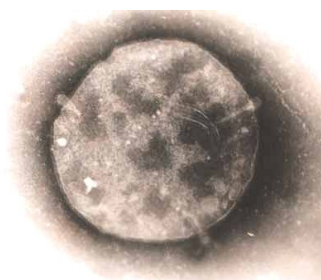
Der Trehalose-Metabolismus vieler Archaeen, ebenso bei *S. solfataricus*, findet in abgewandelter Form statt. Im Gegensatz zum herkömmlichen Weg über Glucose-6-phosphat und Trehalose-6-phosphat findet hier eine amylolytische Reaktion statt, welche Trehalose aus Glykogen herstellt. Dieser Stoffwechselweg beinhaltet zwei Reaktionen. Zunächst katalysiert die Maltooligosyl-trehalose-Synthase (TreY) die Umwandlung einer  $\alpha$ -1,4-Bindung eines Maltodextrins, wie es in Glycogen vorliegt, in eine  $\alpha$ -1,1-Bindung - es entsteht Maltooligosyl-trehalose. Im zweiten Schritt entlässt das Enzym Maltooligosyl-trehalose Trehalohydrolase (TreZ) freie Trehalose (Maruta et al., 1996). Wie vor Kurzem für *T. tenax* beschrieben wurde (Kouril et al., 2008), wurde auch in *S. solfataricus* ein unidirektionaler TreT-Weg gefunden. Hierbei katalysiert die Trehaloseglycosyl-übertragende Synthase (TreT) die Bildung von Trehalose aus UDP-Glucose und Glucose. Die meisten Archaeen haben einen unvollständigen Pentosephosphatweg (PPP). Oft fehlt der oxidative PPP und das Enzymrepertoire für den nicht-oxidativen ist nicht vollzählig.

Dies trifft auch auf *S. solfataricus* zu (Soderberg, 2005). Um dennoch das wichtige Intermediat Ribulose-5-phosphat bilden zu können, das als Vorstufe für die Nukleotidbiosynthese dient, nutzen diese Organismen einen umgekehrten Ribulose-monophosphatweg (RuMP). Dabei wird Fructose-6-phosphat mittels 3-Hexulose-6-phosphat-Isomerase (PHI) und 3-Hexulose-6-phosphat-Synthase (HPS) unter Bildung von Formaldehyd zu Ribulose-5-phosphat umgesetzt. *S. solfataricus* besitzt außerdem noch die beiden Enzyme Transketolase und Ribose-5-phosphat-Isomerase des nicht-oxidativen PPP-Weges (Soderberg, 2005). Dadurch ist die wichtige Voraussetzung gegeben, verschiedene Kohlenhydrate ineinander zu transformieren und als Vorstufen für zahlreiche Stoffwechselwege nutzen zu können, z.B. Synthese von aromatischen Verbindungen aus Erythrose-4-phosphat.

## 1.2 Modellorganismus *Sulfolobus solfataricus*

*Sulfolobus solfataricus* P2 1617 ist ein thermoacidophiles Crenarchaeon mit einem Temperaturoptimum von 80 °C (Toleranzbereich 60-92 °C) und einem optimalen pH-Bereich von 2-4. (Zillig et al., 1980). *S. solfataricus* wurde erstmals Ende der 70er Jahre in heißen Quellen der Pisciarelli Solfataren in Italien von Zillig isoliert.

a)



b)



**Abb. 6** *Sulfolobus solfataricus* (a) und Solfataren in Pisciarelli, Italien (b) Bild-Quelle: Gambacorta und Nicolaus

Die runden Zellen haben einen Durchmesser von ca. 0,8-2 µm und bilden glatte, graue Kolonien. Sie bewegen sich mithilfe von Flagellen fort. Der Organismus ist streng aerob und wächst heterotroph auf verschiedenen Kohlenstoffquellen wie Zuckern, Aminosäuren

und Peptiden (Grogan, 1998). Außerdem besitzt *S. solfataricus* die Fähigkeit, elementaren Schwefel als Energiequelle zu nutzen (Zillig et al., 1980). Autotrophes oder anaerobes Wachstum wurde nicht beobachtet. Die natürliche Umgebung von *S. solfataricus* wird als rau und nährstoffarm beschrieben, weshalb der Organismus einen flexiblen Stoffwechsel benötigt und auf effiziente Anpassungen angewiesen ist. Zudem ist er höchstwahrscheinlich starken Temperaturschwankungen ausgesetzt, was in Relation zum relativ breiten Temperatur-Toleranzbereich steht.

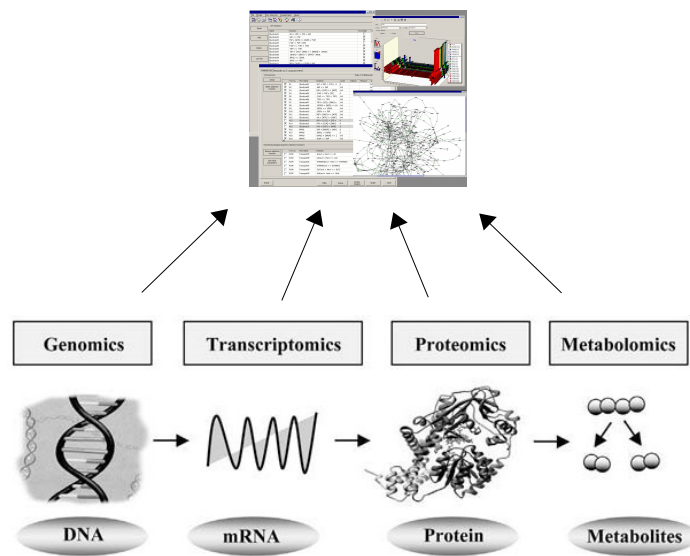
*S. solfataricus* zählt zu den am besten untersuchten hyperthermophilen Organismen aus dem Stamm der Crenarchaeoten. Ein großer Vorteil ist die vergleichsweise einfache Kultivierbarkeit des Organismus unter definierten Bedingungen (Grogan et al., 1998). Das Genom von *S. solfataricus* wurde vollständig entschlüsselt und annotiert (She et al., 2001), es besteht aus  $3 \cdot 10^6$  bp und kodiert ca. 2900 Gene. Zahlreiche umfangreiche Untersuchungen der biochemischen Vorgänge in *S. solfataricus* (Siebers und Schönheit, 2005, Ahmed et al., 2005, van der Oost und Siebers, 2007) sowie Ansätze für vergleichende Genomanalysen, inklusive Transkriptomik und Proteomik (Verhees et al., 2003, Snijders et al., 2006), wurden in den letzten Jahren beschrieben. Molekularbiologische Techniken zur Herstellung von überexprimierenden *Sulfolobus*-Stämmen (Albers et al., 2006) und Deletionsmutanten (Albers und Driessen, 2007) konnten etabliert werden. Zukünftig sollen gezielte *knock outs* von Genen, die in den zentralen Kohlenhydratstoffwechsel involviert sind, neue Erkenntnisse zur Regulation zellulärer Prozesse des Organismus liefern. Bisher ist es gelungen, einen *knock out* des KDG-Kinase-Gens zu erzeugen (Albers, unveröffentlicht). Diese *S. solfataricus*-Mutante wird, neben dem P2 1617, im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

*S. solfataricus* hat sich zu einem der wichtigsten Repräsentanten der Domäne der Archaeen entwickelt, ganz besonders im Hinblick auf die Produktion in der industriellen Biotechnologie. Die Proteine von *S. solfataricus* eignen sich aufgrund ihrer hohen Rigidität besonders gut für die Herstellung von thermostabilen Bioprodukten. Besonders im medizinischen und pharmazeutischen Bereich sind thermostabile Produkte von großem Interesse (Schiraldi et al., 2002). Als Modellorganismus im *Sulfolobus*-systems-biology- (Sulfo-SYS)-Projekt (SysMO; <http://www.sysmo.net>) ist *S. solfataricus* der erste hyperthermophile Organismus im Fokus eines umfassenden, systembiologischen Ansatzes (Albers et al., 2009). Mit seinem modifizierten und vielfältigen Zentralstoffwechsel für den

Abbau von Kohlenhydraten stellt *S. solfataricus* in Bezug auf noch unerforschte Regulationsmechanismen und Energiebilanz des Stoffwechsels ein interessantes Forschungsobjekt dar. Das SulfoSys-Projekt soll die bereits gewonnenen Erkenntnisse über den Organismus nicht nur vertiefen, sondern in einen dynamischen Kontext bringen. (Albers et al., 2009).

### 1.3 Systembiologie

Die Systembiologie vereinigt die sog. „omics“-Technologien, unter anderem Genomik, Transkriptomik, Proteomik und Metabolomik (**Abb. 7**). Jedes dieser Forschungsfelder ermöglicht die quantitative Erfassung einer Fülle von biologischen Molekülen im Hochdurchsatz-Maßstab, aber keine dieser Anwendungen allein kann die Komplexität einer Zelle entschlüsseln. (Zhang et al., 2010). Um die gesamte Struktur und Dynamik dieses Systems zu verstehen, bedarf es der Interaktion auf verschiedenen Ebenen der zellulären Informationen. In den letzten Jahrzehnten galt die Entschlüsselung eines Genoms als das Zentrum aller Ziele in der Erforschung des Lebens. Dennoch bleiben viele Fragen offen. Zur vollständigen Aufklärung der Genfunktionen, des mikrobiellen Metabolismus und seiner Reaktionen auf Umwelteinflüsse ist es notwendig, die Genprodukte auf allen Ebenen und zu bestimmten Zeitpunkten zu charakterisieren (Weckwerth et al., 2003).



**Abb. 7** Genomik, Transkriptomik, Proteomik und Metabolomik als Disziplinen der Systembiologie (Rimbach et al., 2005, modifiziert)

### 1.3.1 Genomik

Die Genomik ist die Erforschung der Gesamtheit aller Gene eines Organismus. Dabei wird die DNA komplett sequenziert. Im Gegensatz zu allen anderen „omics“-Technologien befasst sich die Genomik mit dem stabilen, d.h. innerhalb kürzerer Zeitabstände unveränderbaren, Genom. Dank voranschreitender Entwicklung von Hochdurchsatztechnologien konnten bis heute an die 1000 mikrobielle Genome fast aller bekannten phylogenetischen Abstammungslinien vollständig sequenziert werden (Zhang et al., 2010). Neben der Sequenzierung werden im Bereich der Genomik mithilfe von computergestützten Annotationen Vorhersagen zu Genfunktionen getroffen. Auf diese Weise können vergleichende Analysen bezüglich einer Genfunktion gemacht werden und Rückschlüsse auf Proteine oder regulatorische Netzwerke gezogen werden. Zur Aufklärung evolutiver Verwandtschaftsverhältnisse von Organismen spielt die Genomik ebenfalls eine zentrale Rolle.

### 1.3.2 Transkriptomik

Transkriptomik ist eine Hochdurchsatztechnologie zur Bestimmung des Transkriptoms, der

Gesamtheit aller mRNA-Moleküle in der Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt und unter spezifischen Bedingungen. Anders als in der Genomik sind die Informationen der Transkriptomik nicht statisch und gleichbleibend, sondern sie spiegeln die Aktivität bestimmter Gene zu einem bestimmten Zeitpunkt wieder. Die am weitesten verbreitete Methode ist die Genom-Chip- oder *Microarray*-Technologie (Schena et al., 1995). *Microarrays* ermöglichen eine präzise parallele Erfassung von Genexpression für tausende Genen (im Hochdurchsatz-Maßstab). Es werden quantitative Messungen der mRNA ermöglicht, zum Beispiel von zwei unterschiedlichen Zuständen eines Organismus. Dabei wird zunächst die gesamte mRNA aus den Zellen isoliert und in *cDNA* umgeschrieben. Die *cDNA* des jeweiligen Zustands wird entweder mit einem roten oder grünen Fluoreszenzfarbstoff markiert und auf dem *Array*, einem kleinen Plastik- oder Glasplättchen, welches mit dem organismenspezifischen Genom beschichtet ist, hybridisiert. Dabei bindet die *cDNA* bei komplementärer Basenabfolge an die DNA auf dem *Array*. Anschließend wird das Fluoreszenzsignal jeder Position des *Microarrays* mittels eines Lasers ausgelesen. Informationen zu Unterschieden in der Genexpression zwischen den beiden Zuständen liefern die Positionen und Intensitäten der jeweils entstandenen Mischfarben auf dem *Microarray*.

Zahlreiche Anwendungen, basierend auf der *Microarray*-Technologie, wurden bereits beschrieben, beispielsweise in der Krebsforschung (DeRisi et al., 1996), in der Pflanzenforschung (Schenk et al., 2000) aber auch in der Erforschung von Mikroorganismen (Snijders et al., 2006, Trauger et al., 2008).

### **1.3.3 Proteomik**

Die Gesamtheit aller Proteine in einer Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt und unter bestimmten Bedingungen werden als Proteom zusammengefasst (Graham et al., 2007). Die qualitative und quantitative Erfassung aller Proteine wird als Proteomanalyse bezeichnet. Das Proteom ist ebenso wie das Transkriptom dynamisch und reagiert auf verschiedenste Umwelteinflüsse mit Veränderungen. Es steht im Gleichgewicht zwischen ständiger Neusynthese und Abbau von Proteinen. Im Vergleich zum Transkriptom mit seinen vier unterschiedlichen Basen ist die biochemische Variabilität im Proteom mit 20 verschiedenen Aminosäuren ungleich größer. Damit haben Proteine eine Fülle von wichtigen physiologischen Aufgaben in einer Zelle. Als Katalysatoren chemischer Reaktionen

nehmen sie eine zentrale Rolle in biochemischen Stoffwechselwegen ein. Die am meisten angewandten Methoden zur Erfassung des Proteoms einer Zelle sind einerseits die zweidimensionale (2D) Gel-Elektrophorese (O'Farrell, 1975) gekoppelt mit MALDI-TOF-MS (Shevchenko et al., 2000), sowie LC-MS-MS-Methoden (Chong und Wright, 2005). Die Wahl einer Methode richtet sich nach der spezifischen Fragestellung. Bei der 2D-Elektrophorese erfolgt die Trennung von Proteingemischen durch eine Kombination von isoelektrischer Fokussierung und Bestimmung des Molekulargewichts (SDS-PAGE). Dadurch wird eine sehr hohe Auflösung erreicht. Vorteile sind die Visualisierbarkeit einer großen Anzahl an Proteinen gleichzeitig in einem Gel und die Detektionsmöglichkeit von Modifikationen und Isoformen. Nach der Vortrennung erfolgt die Identifizierung anhand der Masse eines Proteins mittels MALDI-TOF-MS. Bei LC-MS-Methoden erfolgt die Trennung mithilfe chromatographischer Verfahren mit einer anschließenden massenspektrometrischen Charakterisierung. Die Identifizierung wird meist mit Tandem-massenspektrometrie (MS-MS) verbessert.

### 1.3.4 Metabolomik

Metabolite spielen als Intermediate in biochemischen Stoffwechselwegen eine sehr wichtige Rolle. Es handelt sich um niedermolekulare, nicht-polymere und organische Verbindungen, die den Zustand einer Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt charakterisieren. Zu den Metaboliten zählen beispielsweise Aminosäuren, Zucker, Fettsäuren, Dicarbonsäuren, Polyamine und auch Energieträger und Cofaktoren wie ATP und NADP. Die Gesamtheit aller Metabolite einer Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt wird als Metabolom bezeichnet. Zusammengefasst werden Anwendungen zur Analyse des Metaboloms oder Teilen davon in der Metabolomik, welche als einer der jüngsten Zweige der „omics“-Technologien gilt. Das Metabolom schließt sowohl intrazelluläre Verbindungen (Endometabolom) als auch extrazelluläre (Exometabolom) ein. Wie auch das Transkriptom und das Proteom ist das Metabolom nicht statisch, sondern es reagiert mit teilweise starken und schnellen Änderungen auf genetische Veränderungen oder Umwelteinflüsse. Quantitative Analysen ermöglichen somit entscheidende Aussagen über den Phänotyp einer Zelle oder eines Gewebes.

Die Analyse des Metaboloms ist Schwerpunkt dieser Arbeit und wird im weiteren Verlauf detailliert beschrieben.



## 1.4 Methoden in der Metabolomanalyse

Obwohl es sich um einen relativ jungen Zweig in der Wissenschaft handelt, existieren mittlerweile zahlreiche Ansätze zur Analyse des Metaboloms. Grob lassen sich *Metabolomics*-Anwendungen in gerichtete (*targeted*) und ungerichtete (*untargeted*) Analysen einteilen.

Die *Targetanalyse* ist die Quantifizierung eines oder einiger ausgewählter Stoffe, z.B. Metabolite eines bestimmten Stoffwechselweges. Diese Methode setzt meist sehr hohe Sensitivität voraus und wird oft im diagnostischen Bereich eingesetzt (Fiehn et al., 2001). Unter *Targetanalyse* fällt beispielsweise das *Metabolite profiling*, das die Analyse einer vordefinierten Gruppe von Metaboliten, z.B. einer bestimmten chemischen Klasse oder spezifischen Stoffwechselwegen, beschreibt. Die Anwendung ist in der Regel schnell und erfordert keine absolute Quantifizierung. Beim *Metabolic fingerprinting* werden mit statistischen Methoden metabolische Profile verglichen. Diese Methode erlaubt eine schnelle Klassifizierung von Proben gleichen Ursprungs oder gleicher biologischer Relevanz (Fiehn, 2002). Eine Identifizierung und Quantifizierung von Metaboliten ist hier nicht notwendig.

*Untargeted*-Ansätze verfolgen das Ziel, so viele Metabolite einer biologischen Matrix wie möglich zu erfassen. Dabei werden auch unbekannte, in der verwendeten Stoffbibliothek nicht hinterlegte Verbindungen, berücksichtigt. *Untargeted*-Ansätze sind bisher das übergeordnete Ziel und eine große Herausforderung für die Wissenschaft. Anders als beim Transkriptom und Proteom ist es in der Metabolomik bis jetzt nicht möglich, alle Metabolite mit nur einer Methode zu analysieren. Aufgrund der großen Diversität der chemischen Strukturen und Eigenschaften von Metaboliten bedarf es mehrerer analytischer Methoden (Nielsen et al., 2005).

Die Metabolomanalyse wächst rasant zu einem großen Forschungsfeld. Besonders in der Pflanzenforschung findet sie breite Anwendung (Fiehn, 2002, Kopka et al., 2004). Auch im mikrobiologischen Bereich hat die Erforschung des gesamten Metaboloms eines Organismus stark zugenommen (Bolten et al., 2007, Strelkov et al., 2004, Mashego et al., 2007).

Die am weitesten verbreitete Technologie für die Metabolomanalyse ist Gaschromatographie (GC-MS) gekoppelt mit Massenspektrometrie (Fiehn et al., 2000, Villas-

Boas et al., 2005a, Strelkov et al., 2004, Börner et al., 2007, Frimmersdorf et al., 2010), aber auch Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS) (Tolstikov et al., 2002, Buchholz et al., 2002) oder die Kopplung mit Kapillarelektrophorese (CE) (Soga et al., 2003, Monton et al., 2007) findet breite Anwendung.

Die größten Vorteile der Massenspektrometrie sind eine hohe Sensitivität und die Möglichkeit zu Hochdurchsatzanwendungen (Villas-Bôas et al., 2005a). Zusätzlich besteht mit der Tandem-Massenspektrometrie die Möglichkeit, zwei Massenspektrometer miteinander zu koppeln (MS-MS) (Feng et al., 2008), vor allem um Fragmentierungen genauer zu untersuchen und um die Sensitivität zu verbessern.

Die GC-MS bietet die Möglichkeit, schnell, einfach und relativ preiswert eine Fülle von chemischen Verbindungen gleichzeitig zu analysieren und sehr reproduzierbare Ergebnisse erzielen zu können. Diese robuste Technologie erlaubt aufgrund der stabilen Massenfragmente der Metabolite die Erstellung und Nutzung von umfangreichen Referenzbibliotheken. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die GC-MS-Technik angewandt und wird in **Kap. 1.4.2** näher beschrieben.

Eine Kopplung aus LC und MS wird angestrebt, um größere, nicht-flüchtige Verbindungen detektieren zu können, welche mittels GC-MS nicht erfasst werden können. Während der Massenbereich oberhalb von 800 Da mit der GC-MS nicht mehr erfassbar ist, können mit LC-MS je nach Anwendung Molekülmassen von mehreren 1000 Da analysiert werden (Villas-Bôas et al., 2005a). LC-MS ist somit eine wertvolle ergänzende Methode zur GC-MS, um den metabolischen Fingerabdruck eines biologischen Systems erweitern zu können. Von großem Interesse ist die Analyse sekundärer Metabolite mit LC-MS (Hostettmann und Wolfender, 1997).

Voraussetzungen für eine erfolgsversprechende Metabolomanalyse sind Schnelligkeit, Reproduzierbarkeit, Robustheit, Sensitivität und die Möglichkeit zur Automatisierung (Weckwerth et al., 2003). Überwiegend wird dabei mit relativen Konzentrationen der identifizierten Metabolite gearbeitet. Doch auch die absolute Quantifizierung im Rahmen einer komplexen Metabolomanalyse ist möglich (Bennett et al., 2008). Ein wichtiges Teilgebiet in der *Metabolomics*-Anwendung ist die Identifizierung von neuen, bisher unentdeckten chemischen Verbindungen (Tolstikov et al., 2007).

Eine weitere häufig angewandte Methode in der Metabolomanalyse stellt die NMR- (*Nuclear Magnetic Resonance*)-Spektroskopie dar (Beckonert et al., 2007). Die NMR-

Spektroskopie zeichnet sich durch ihre Eigenschaft aus, eine exakte Strukturaufklärung unbekannter Verbindungen durchführen zu können (Shockcor et al., 1996). Ein Vorteil der NMR-Spektroskopie liegt in der Möglichkeit zur direkten Quantifizierung aller Metabolite anhand eines einzigen, definiert zugesetzten Standards. Die arbeits- und zeitaufwendige Aufnahme von Kalibrationskurven bleibt somit aus. Nachteile einer NMR-Anwendung sind eine relativ niedrige Sensitivität, eine lange Messzeit und hohe Anschaffungskosten im Vergleich zu massenspektrometrischen Technologien (Villas-Boas et al., 2005a). NMR kann auch mit MS gekoppelt werden, was zu einer höheren Sensitivität führt (Shockcor et al., 1996).

Beide Methoden, sowohl NMR als auch MS, sind gut geeignet für eine quantitative sowie qualitative Metabolomanalyse von biologischen Proben.

#### **1.4.1 Aufarbeitung der Proben**

Für eine reproduzierbare und verlässliche Metabolomanalyse ist ein strenges Aufarbeitungsprotokoll die wichtigste Voraussetzung. Im Gegensatz zu Transkriptom- und Proteomanalysen muss bei der Analyse von Metaboliten aufgrund hoher Umsetzungsraten sehr schnell gearbeitet werden (Wendisch et al., 2006). Die große Variabilität zellulärer Strukturen, z.B. gram-negative und gram-positive Bakterien, macht es unmöglich, eine einheitliche Aufarbeitungsmethode zu entwickeln. Aus diesem Grund setzen die meisten Anwendungen Zell- bzw. Organismen-spezifische Aufarbeitungsmethoden voraus (Villas-Bôas et al., 2007). Weiterhin ist es sehr wichtig, mit Replikaten zu arbeiten, da biologische und analytische Schwankungen nicht ausgeschlossen werden können. Von essentieller Bedeutung ist es außerdem, eine angemessene Zellmenge für die Analyse zu bestimmen. Intrazelluläre Metabolitkonzentrationen weisen beträchtliche Unterschiede auf. Während z.B. Glucose in den meisten Zellen im millimolaren Bereich vorliegt, kommen Stoffe, die für die Signalübertragung zuständig sind, nur in Spuren vor (Villas-Bôas et al., 2007).

Wird mit der Biotrockenmasse eines Organismus gearbeitet, ist bei der großen Variabilität von Zellstrukturen das Verhältnis von Cytosol zu Zellhülle ein wesentlicher Faktor beim Vergleich metabolischer Profile, der nicht zu unterschätzen ist. Kleinere Zellen könnten bei gleicher Biotrockenmasse weniger Cytosol und damit weniger Metabolite aufweisen als größere Zellen. Die meisten Applikationen, wie auch in der vorliegenden Arbeit, erfordern die Trennung von intra- und extrazellulären Metaboliten. Somit ist der wohl zeitauf-

wendigste Schritt das Waschen der Zellen (Villas-Bôas et al., 2005).

### **Quenching**

Ein sehr kritischer Schritt bei der Metabolomanalyse ist das vollständige Abstoppen aller enzymatischen Vorgänge in der Zelle zum Erntezeitpunkt - das Quenching. Viele Metabolite des Primärstoffwechsels haben sehr schnelle Umsetzungsraten, die zum Teil im Bereich von Sekunden und weniger liegen (Schaefer et al., 1999).

Metabolitkonzentrationen können sich bei plötzlicher Änderung der Umgebung einer Zelle rapide verändern und würden das gewünschte Ergebnis - nämlich die Momentaufnahme des Metabolismus - unweigerlich verfälschen. Mehrere Ansätze zum Quenching wurden in jüngerer Zeit beschrieben, wie z.B. das Einfrieren in flüssigem Stickstoff (Mashego et al., 2003) oder chemische Methoden mit Perchlorsäure (Weuster-Botz, 1997). Die Methode muss jedoch kompatibel mit den anschließenden Anwendungen sein, was auf die meisten chemischen Methoden im Rahmen einer Analyse mit GC-MS nicht zutrifft (Fiehn, 2002). Die gängigste Methode für Mikroorganismen ist das Quenchen mit kaltem Methanol (de Koning et al., 1992, Villas-Bôas et al., 2005, Loret et al., 2007), welches sich am besten bei dem Eukaryoten *Saccharomyces cerevisiae* bewährt hat. Bei vielen Prokaryoten ist jedoch der Verlust intrazellulärer Metabolite ins Kulturmedium aufgrund von porösen Zellen problematisch, induziert durch einen Kälteschock (Wittmann et al., 2004). Es ist somit auch schwierig, eine geeignete Quenching-Methode für verschiedene Zelltypen zu finden. Kürzlich wurde eine Quenching-Methode mit kaltem Ethanol für die Organismen *Corynebacterium glutamicum*, *Escherichia coli* und *S. cerevisiae* etabliert (Spura et al., 2009). Diese hat sich gegenüber der Methode mit kaltem Methanol bewährt.

Für hyperthermophile Archaeen, welche eine völlig andere Zellwand- und Zellmembranstruktur aufweisen als Pro- und Eukaryoten, gibt es bislang keine Ansätze zum Abstoppen des Metabolismus. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Quenching-Methoden getestet und mit der Arbeitsgruppen-internen Aufarbeitungsprozedur (Strelkov et al., 2004) ohne Quenching verglichen.

### **Extraktion von Metaboliten**

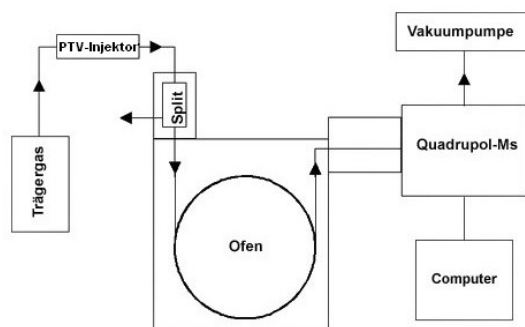
Um die intrazellulären Metabolite einer Analyse zugänglich machen zu können, müssen sie aus den Zellen extrahiert werden. Dies geschieht über die Zelllyse. Das Ziel ist es, so viele

Metabolite wie möglich zu erhalten und Degradation sowie chemische Umwandlungen zu vermeiden (Villas-Bôas et al., 2005). Organische Lösungen wie Methanol, Ethanol, Aceton etc. werden weit verbreitet als Extraktionsmittel für Metabolite eingesetzt (Fiehn, 2002). Der weitere Zusatz nicht-polarer Lösungen wie Chloroform oder Hexan trennt polare von nicht-polaren Metaboliten (Dunn et al., 2005). Unterstützt wird die Extraktion mittels Zuführen von Energie, z.B. in thermischer Form und/oder mechanischen Methoden wie z.B. Mörser, Rührwerkskugelmøhlen, Homogenisatoren oder auch mithilfe von Ultraschall (Fiehn, 2002, Dunn et al., 2005, Strelkov et al., 2004). Ein großes Problem ist der Zerfall von energiereichen Metaboliten in wässriger Lösung (Kimball und Rabinowitz, 2006). Die in dieser Arbeit angewandte Extraktionsmethode in Methanol, Wasser und Chloroform erwies sich jedoch auch für phosphorylierte Verbindungen als gut und reproduzierbar (Strelkov et al., 2004).

#### **1.4.2 Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)**

Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie ist eine weit verbreitete Methode in der Metabolomanalyse. Sie besitzt eine sehr hohe Effizienz, tausende chemische Komponenten in komplexen biologischen Proben zu trennen (Villas-Bôas et al., 2005a). Außerdem ermöglicht die einfache Kopplung eines Massenspektrometers an den Gaschromatographen eine zuverlässige Identifizierung und Quantifizierung der Substanzen. GC-MS bietet die Vorteile eines relativ preiswerten und mittlerweile leicht zu bedienenden Systems für die Metabolomanalyse. Die Analyse schließt eine Fülle von verdampfenden, kleinen Verbindungen ein, welche polar oder unpolar sein können.

Voraussetzung für eine Analyse mit GC-MS ist die chemische Derivatisierung der Analyten, um nicht- oder halbflüchtige Metabolite in die Gasphase überführen und ihnen thermische Stabilität verleihen zu können. Dabei werden stark polare Gruppen in weniger polare umgewandelt. Die gängigste Derivatisierungsmethode ist die Silylierung mit N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamid (MSTFA). Dabei werden aktive Wasserstoffatome, z.B. von Hydroxylgruppen, Thiolen, Aminen und Carboxylgruppen, durch eine Trimethylsilyl-Gruppe (TMS-Gruppe) ersetzt (Villas-Bôas et al., 2005). Eine vorangegangene Methoxymierung aller Keto- und Aldehydgruppen von Zuckerverbindungen reduziert die Anzahl an Isomeren (Adams et al., 1999).



**Abb. 8** Grundaufbau eines GC-MS (Bildquelle: dki-online.de, modifiziert)

In **Abb. 8** sind die wichtigsten Bestandteile eines GC-MS-Gerätes dargestellt. Es besteht im wesentlichen aus drei Teilen: einem Injektor, einem Gaschromatographen mit Trennsäule und einem Massenspektrometer. Die flüssigen Proben werden zunächst über den Injektor in den Gaschromatographen injiziert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein sog. *programmed temperature vaporizer* (PTV)-Injektor verwendet. Bei dieser Art der Injektion wird die kalte Probe zunächst in eine Verdampfungskammer überführt. Erst dann wird ein Temperaturprofil aktiviert und der Injektor heizt sich innerhalb weniger Sekunden auf 350 °C auf. Die gasförmige Probe wird zum Teil (*split*) oder komplett (*splitless*) über die mobile Phase auf die Trennsäule (stationäre Phase) geleitet. Die mobile Phase ist ein inertes Gas, welches keine Wechselwirkungen mit den Analyten und der stationären Phase eingehen soll. Meistens wird Helium verwendet. Die Trennung wiederum beruht auf der Stärke der Wechselwirkungen der Analyten mit der stationären Phase. Dies nennt man Retention. Jede Substanz hat ihre spezifische Retentionszeit. Die eluierende Substanz wird anschließend detektiert und in Form eines Peaks in einem Chromatogramm gegen die Zeit aufgetragen.

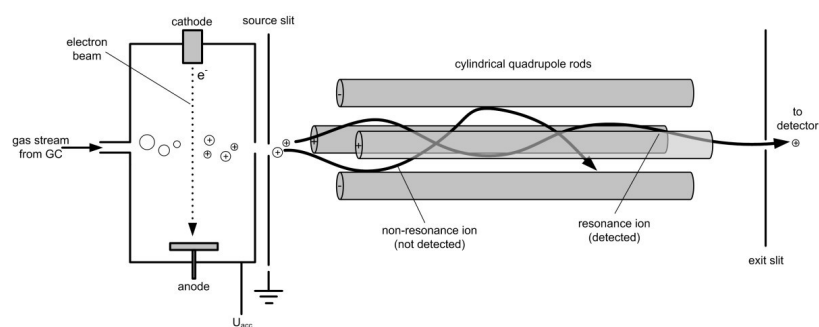
Der Einfluss der Temperatur auf einen Metaboliten spielt eine entscheidende Rolle beim Retentionsverhalten. Besonders bei Trennungen von Gemischen mit einem breiten Flüchtigkeitsbereich ist die Anwendung eines Temperaturgradienten von großem Vorteil.

Die Schnittstelle zwischen GC und MS bildet die Ionenquelle. Hier erfolgt die Ionisierung der Moleküle mittels Elektronenionisation (EI). Die Verbindungen werden dabei mit einem Elektronenstrahl aus einem Filament mit einer Energie von 70 eV beschossen (**Abb. 9**). Bei der Kollision mit den energiereichen Elektronen entstehen positiv geladene Ionen. Da

die Ionisierungsenergie für organische Verbindungen bei etwa 10 eV liegt, zerfallen sie bei der viel höheren Energie von 70 eV zu kleineren, charakteristischen Massenfragmenten. Der Vorteil dieser Energiestärke ist, dass sie für eine aufschlussreiche Ionisierung und Fragmentierung ausreicht und zudem stabil und reproduzierbar ist, so dass für jede Substanz charakteristische Fragmentierungsmuster zu jeder Zeit gewährleistet sind und in öffentlichen Datenbanken wie der *NIST-Bibliothek (National Institute of Standards and Technology)* gesammelt werden können. Falls Fragmentierung verhindert werden soll, beispielsweise um Informationen über die molekulare Masse einer unbekannten Verbindung zu erhalten, wird die „weichere“ chemische Ionisation (CI) bevorzugt. Die resultierenden Massenspektren sind deutlich fragmentärmer als entsprechende EI-Spektren und zeigen höhere Intensitäten an Ionen, die das intakte Molekül enthalten (Quasimolekularion).

Nachdem die Ionen im Quellen-Sektor gebildet wurden, werden sie durch ein elektrisches Feld beschleunigt und dann in den Analysator eingeleitet. Dort werden die Ionen im Hochvakuum anhand ihres Masse-zu-Ladungsverhältnisses aufgetrennt.

Es gibt unterschiedliche Typen von Massenanalysatoren. Kontinuierliche Analysatoren selektieren die Ionen und übertragen nur einen bestimmten  $m/z$ -Bereich zum Detektor. Das komplette Spektrum wird anschließend durch das sog. *scannen* des Analysators über den gesamten Bereich der  $m/z$ -Werte erreicht. Diese Art von Analysatoren wird auch Massenfilter genannt. Dazu zählt das in dieser Arbeit verwendete Quadrupol-MS. Dieses besteht aus 4 zylindrischen parallel zueinander angeordneten Stäben, an die sowohl eine Gleichspannung als auch eine Wechselspannung angelegt ist (**Abb. 9**).



**Abb. 9** Schematische Darstellung eines Quadrupol-Massenspektrometers mit vorangehender Elektronenionisation (Wittmann, 2007).

Jedes Stabpaar weist gegensätzliche Spannungen auf. Die Ionen durchfliegen zentral dieses elektrische Wechselfeld und werden anhand ihres  $m/z$ -Verhältnisses getrennt, da nur bestimmte Ionen stabile Bahnen auf ihrem Weg durch den Analysator beschreiben. Diese werden herausgefiltert. Alle anderen Ionen, die sich auf instabilen Bahnen bewegen, werden aussortiert. Durch Variation des elektrischen Wechselfeldes können nacheinander verschiedene  $m/z$ -Verhältnisse den Analysator verlassen bzw. *gescannt* werden, um dann vom Detektor erfasst zu werden.

Gepulste Analysatoren nehmen das gesamte Spektrum eines „Pulses“ von unterschiedlichen Ionen gleichzeitig auf, so z.B. im *Time of flight* (TOF)-Analysator. Die Massenbestimmung erfolgt hier über eine sehr genaue elektronische Messung der Flugzeit der Ionen. Beim Eintritt in den Analysator haben alle Ionen die gleiche Energie, somit sind leichte Ionen schneller als schwere und erreichen den Detektor früher. Ein Vorteil von TOF-Analysatoren ist die hohe Massengenauigkeit, was in Bezug auf die Aufklärung von Molekülstrukturen von Bedeutung sein kann.

## 1.5 Kultivierung im Bioreaktor

In der Biotechnologie ist die Produktion bestimmter Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen von zentraler Bedeutung. Um diese zu optimieren, ist eine Anzucht in Bioreaktoren unumgänglich. Dabei können für den jeweiligen Organismus optimale Bedingungen, wie Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffeintrag und Substratzufuhr, geschaffen und im Verlauf der Kultivierung kontrolliert werden. Zudem können die Produktausbeuten bei Reaktoren mit mehreren 100 L-Fassungsvermögen sehr groß sein.

Das Übertragen definierter Kultivierungsbedingungen von einem kleinen auf einen größeren Maßstab und die damit verbundene Erhöhung des Kulturvolumens (*scale up*) ist häufig mit Schwierigkeiten verbunden. Meistens treten Stofftransportprobleme auf, die prozesslimitierend sind. Der Stofftransport erfolgt mittels Diffusion, und da der innere Turbulenzmaßstab in einem Bioreaktor wesentlich größer ist als im Schüttelkolben, ist der Transport abhängig von der Konzentration der gelösten Stoffe (Kudrewitzki, 1984). Das wesentliche Ziel der Maßstabsübertragung besteht somit darin, eine ähnliche Konzentrationsverteilung an lebensnotwendigen Substraten zu gewährleisten wie im kleinen Maßstab.

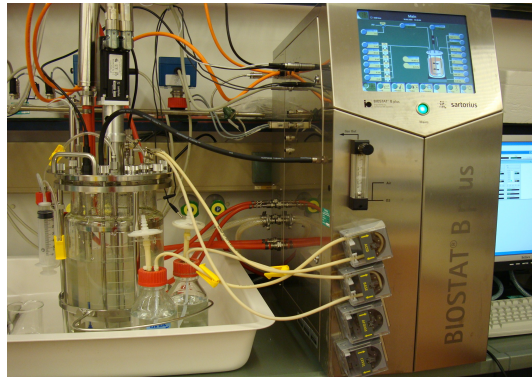


Der kritischste Punkt beim *scale up* ist die Sauerstoffversorgung. Bei aeroben Prozessen ist Sauerstoff eine der wichtigsten und am meisten verbrauchten Komponenten des Nährmediums, die Transportgeschwindigkeit von der Gasphase in die flüssige Phase ist jedoch vergleichsweise gering. Die Löslichkeit von Sauerstoff im Wasser nimmt mit zunehmender Temperatur ab und wird zusätzlich durch Faktoren wie Elektrolyte oder Antischaummittel im Medium verringert (Chmiel, 2006). Da der Sauerstofftransport mithilfe von Gasblasen um ein Vielfaches schneller und effektiver ist, muss eine gute Durchmischung und Belüftung des Mediums gewährleistet sein. Dies kann z.B. durch Belüftungssysteme mit sehr geringen Porendurchmessern, welche sog. Mikro-Gasblasen generieren, optimiert werden (Czermak et al., 2005). Auf diese Weise wird die gesamte Kontaktfläche zwischen Gas- und Flüssigphase und damit die Sauerstofftransportrate stark erhöht. Zusätzlich werden dadurch Scherkräfte, die durch das Zerplatzen von Gasblasen hervorgerufen werden können, reduziert.

Trotz ihres Potentials für biotechnologische Anwendungen ist die Kultivierung von thermoacidophilen Mikroorganismen im Großmaßstab bis heute eine große Herausforderung. Diese Organismen besitzen sehr robuste Enzyme, wie z.B. die extrazelluläre polymerspaltende  $\alpha$ -Amylase vieler thermoacidophiler Organismen (Bertoldo et al., 2004). Enzyme mit einer gleichzeitigen Säure- und Thermotoleranz sind sehr selten und aus diesem Grund für die Biotechnologie von großer Bedeutung. Zur Gewinnung von Biomolekülen und biochemischen Analysen sind ausreichende Mengen an Biomasse erforderlich (Worthington et al., 2003), Extremophile erreichen jedoch meistens nur geringe Zelldichten im Vergleich zu Organismen, die in nicht extremen Umgebungen vorkommen.

Zudem sind lange Kultivierungsprozesse unter sehr hohen Temperaturen und teilweise stark säurehaltigen Medien nicht selten mit Schwierigkeiten verbunden. So stellt häufig Verdunstung ein Problem dar (Park und Lee, 1997). Die Folge ist eine zu starke Konzentrationserhöhung von Medienbestandteilen und toxischen Nebenprodukten. Viele Substrate sind bei hohen Temperaturen instabil und die Löslichkeit von Gasen, insbesondere  $O_2$ , sinkt dramatisch (Holst et al., 1997). Ein weiterer kritischer Punkt ist die Beschaffenheit des Kultivierungssystems. Viele herkömmliche Bioreaktoren werden aus nicht rostfreiem Stahl hergestellt und sind somit für säurehaltige Kulturmedien nicht geeignet sind (Worthington et al., 2003). Um dies zu umgehen, sollten die mit der Kultur in

Kontakt stehenden Teile entweder aus rostfreiem Stahl oder Glas bzw. Keramikmaterial bestehen.



**Abb. 10** Ausstattung des in dieser Arbeit verwendeten 5 L-Bioreaktors.

Extremophile neigen schnell zu Substrat- und Produktinhibierung bei vergleichsweise niedrigen Konzentrationen. Es besteht die Annahme, dass die Akkumulation von Nebenprodukten, insbesondere bei Wachstum in Komplexmedien, den limitierenden Faktor bei der Kultivierung von *S. solfataricus* darstellt (Park und Lee, 1999). Bei hohen Temperaturen zerfallen viele Substrate schnell und reagieren miteinander. Besonders für kontinuierliche, sog. *fed-batch*-Kultivierungen, hat es sich bewährt, die Kultur mit einem Filtrations- bzw. Dialysesystem zu verbinden, welches die toxischen Nebenprodukte aus dem Kulturmedium entfernt. Damit konnten bislang erhebliche Steigerungen in der Biomasseproduktion (bis zu 20fach) von Extremophilen erzielt werden (Krahe et al., 1996, Schiraldi et al., 1999).

Ein wesentlicher Vorteil bei Kultivierungen von Thermoacidiphilen ist das geringe Risiko von Kontaminationen (Rinker et al., 1999).

## 1.6 Ziele der Arbeit

Extremophile Organismen sind noch vergleichsweise wenig erforscht und gerade die Anpassung an lebensfeindliche Nischen ist ein faszinierendes und bedeutsames Thema in der Wissenschaft. Im Rahmen eines systembiologischen Kooperationsprojekts liegt das Ziel darin, auf mehreren zellulären Ebenen mögliche Anpassungsstrategien des zentralen Kohlenhydratstoffwechsels des hyperthermophilen Archaeons *Sulfolobus solfataricus* bei Variationen der Kultivierungstemperatur zu erforschen. Die Analyse des Metaboloms bildet den Schwerpunkt dieser Arbeit.

Nach neuestem Stand liegen bislang noch keine Metabolomdaten für *S. solfataricus* vor. Demzufolge soll zunächst eine qualitative Analyse des Metaboloms mittels einer für Bakterien entwickelten GC-MS-Methode für polare Metabolite durchgeführt werden. Wichtige Unterschiede zu bereits vorhandenen metabolischen Profilen mesophiler Bakterien sollen detektiert werden. Voraussetzung dafür ist zunächst die Etablierung der Kultivierungsbedingungen und die Bestimmung mikrobiologischer Parameter für *S. solfataricus*. Weiterhin muss die Aufarbeitungsmethode für die Metabolomanalyse, welche ebenfalls für mesophile Bakterien etabliert worden ist, für den hyperthermophilen Organismus optimiert werden. Im Vordergrund steht das Abstoppen aller enzymatischen Vorgänge in der Zelle zum Erntezeitpunkt - das sog. Quenching.

Mit dem Ziel, wichtige Kultivierungsparameter wie pH-Wert, Begasungsrate und Temperatur konstant zu halten und zusätzlich größere Zellvolumina zu erhalten, soll die Kultivierung in einem 5 L-Bioreaktor etabliert und damit ein *scale up* von 0.1 L auf 3 L erreicht werden. Als zentrale Fermentationsstelle ist die Verteilung von Zellmaterial an alle Kooperationspartner eine wichtige Aufgabe.

Auf dieser Grundlage sollen anschließend semiquantitative Vergleiche identifizierter Metabolite des Zentralstoffwechsels Aufschluss über mögliche Adaptationsstrategien bei Temperaturen unterhalb des Optimums geben. Neben der Optimaltemperatur von 80 °C werden Kultivierungstemperaturen von 70 °C und 65 °C untersucht. Darüber hinaus sollen Veränderungen im Zentralstoffwechsel bei Temperaturstress in Form eines Kälte- und Hitzeschocks analysiert werden. Die Metabolomdaten sollen anschließend mit den Transkriptom- und Proteomdaten der Kooperationspartner sinnvoll zusammengefügt und diskutiert werden. Neben der Analyse des Zentralstoffwechsels sollen auch Metabolite der

peripheren Stoffwechselwege in die Betrachtung mit einbezogen werden und ggf. auch unbekannte, jedoch reproduzierbare Verbindungen mit einer biologischen *response* genauer untersucht werden.

Um eventuell weitere Anhaltspunkte bezüglich der Regulation des Stoffwechsels zu erlangen, soll eine *knock out* Mutante mit einer Deletion im Zentralstoffwechsel untersucht und ebenfalls Vergleiche bei Temperaturvariationen durchgeführt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien, Kits, Materialien und Geräte

**Tab 1.** Herstellerliste der verwendeten Chemikalien

Bezeichnung	Reinheit	Hersteller
$\alpha$ -D(+)-Glucose Monohydrat	$\geq 99.5 \%$	Carl Roth, Karlsruhe, D
$\alpha$ -D-Glucose-1-phosphat Dinatriumsalz Monohydrat	$\geq 99.5 \%$	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
$\alpha$ -D-Glucose-6-phosphat Dinatriumsalz Tetrahydrat	$\geq 98.0 \%$	Carl Roth, Karlsruhe, D
$\alpha$ -Ketoglutar säure	$\geq 99.0 \%$	Carl Roth, Karlsruhe, D
$\alpha$ , $\beta$ -Trehalose	$\geq 98.0 \%$	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Agmatin Sulfatsalz	97 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Ammoniumsulfat	$\geq 99.5 \%$	Carl Roth, Karlsruhe, D
Biotin	$> 98.0 \%$	Serva, Heidelberg, D
Borsäure	$\geq 99.8 \%$	Carl Roth, Karlsruhe, D
Bernsteinsäure Dinatriumsalz Hexahydrat	$> 99.0 \%$	Carl Roth, Karlsruhe, D
Brain Heart Infusion		Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Brenztraubensäure Natriumsalz	$\geq 99.0 \%$	Carl Roth, Karlsruhe, D
Calciumchlorid Dihydrat	$\geq 99.0 \%$	Carl Roth, Karlsruhe, D
Cyclohexan	$\geq 99.5 \%$	Fluka Chemie GmbH, Oberhaching, D
Deuteriumoxid	99.9 %	Deutero GmbH, Kastellaun, D
D(+)-Galactose	$\geq 99.0 \%$	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
D-Fructose-1,6-bisphosphat Trinatriumsalz Oktahydrat	$\sim 99.0 \%$	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
D-Fructose-6-phosphat Dinatriumsalz Hydrat	98.0 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
delta-Gluconolacton	99.0 %	Acros Organics, Geel, B

## Material und Methoden

Bezeichnung	Reinheit	Hersteller
D-Gluconsäure Kalziumsalz	≥ 98.5 %	Carl Roth, Karlsruhe, D
D(+)-Glycerinsäure Kalziumsalz	99.9 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Dihydroxyacetonphosphat Dilithiumsalz	≥ 95.0 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
D-Ribose 5-phosphat Natriumsalz Hydrat	≥ 98.0 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
D-Ribulose 5-phosphat Dinatriumsalz	≥ 96.0 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
D(-)-2-Phosphoglycerinsäure		Fluka, Freiburg, D
D(-)-3-Phosphoglycerinsäure Dinatriumsalz	~ 95.0 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
D(-)-Fructose	> 99.5 %	Carl Roth, Karlsruhe, D
D(+)-Äpfelsäure	≥ 99.0 %	Carl Roth, Karlsruhe, D
D(+)-Glycerinaldehyd	≥ 98.0 %	Fluka, Freiburg, D
DL-Glycerinaldehyd 3-phosphat Lösung, 45-55 mg/mL		Sigma-Aldrich, Steinheim, D
DL-Isozitronensäure	≥ 93.0 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Di-Kaliumhydrogenphosphat Trinatriumsalz	≥ 99.0 %	Carl Roth, Karlsruhe, D
Di-Natriumhydrogenphosphat	≥ 99.0 %	Carl Roth, Karlsruhe, D
Di-Natriummolybdat-Dihydrat	≥ 99.5 %	Carl Roth, Karlsruhe, D
Di-Natriumtetraborat-Dodecahydrat	≥ 99.0 %	Carl Roth, Karlsruhe, D
Dipropylenetriamin	≥ 99.0 %	Alfa Aesar GmbH, Karlsruhe, D
Docosan	99.0 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Dodekan		Carl Roth, Karlsruhe, D
Dotriacontan	97.0 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Eisen(II)sulfat-Heptahydrat	≥ 99.0 %	Carl Roth, Karlsruhe, D
Ethanol	HPLC	Carl Roth, Karlsruhe, D
Fumarsäure	≥ 99.0 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Galactonsäure Kalziumsalz		Acros Organics, Geel, B

Bezeichnung	Reinheit	Hersteller
Glycerin		Zentrales Lager für Chemikalien TU-Braunschweig, D
Glyoxylsäure Natriumsalz Monohydrat	~ 95.0 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Hefeextrakt		Serva, Heidelberg, D
HEPES	≥ 99.5 %	Carl Roth, Karlsruhe, D
Hexatriacontan	98 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Kaliumaluminiumsulfat Dodecahydrate	≥ 98.0 %	Carl Roth, Karlsruhe, D
Kaliumdihydrogenphosphat	≥ 99.0 %	Carl Roth, Karlsruhe, D
2-Keto-3-deoxygluconat		Eigenherstellung Uni Duisburg
Kobalt(II)chlorid Hexahydrat	≥ 99.0 %	Carl Roth, Karlsruhe, D
Kupfer(II)chlorid-Dihydrat	≥ 99.0 %	Carl Roth, Karlsruhe, D
Kupfer(II)sulfat Pentahydrat	≥ 99.5 %	Carl Roth, Karlsruhe, D
Magenesiumsulfat-Heptahydrat	≥ 99 %	Carl Roth, Karlsruhe, D
Mangan(II)chloride-Tetrahydrat	≥ 99 %	Carl Roth, Karlsruhe, D
Mangan(II)sulfat Monohydrat	≥ 99.0 %	Carl Roth, Karlsruhe, D
Methanol		Fisher Scientific, Schwerte, D
Methoxyaminhydrochlorid	≥ 98 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
N,N'-Bis(3-aminopropyl)-1,3- propanediamin	97 %	Alfa Aesar GmbH, Karlsruhe, D
N-Methyl-N-(trimethylsilyl)- trifluoracetamid	≥ 99.5 %	CS-Chromatographie, Langerwehe, D
Natriumchlorid	≥ 99.5 %	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumhydroxid	≥ 99 %	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriummolybdat Dihydrat	≥ 99.5 %	Carl Roth, Karlsruhe, D
Nickel(II)chlorid Hexahydrat	≥ 98.0 %	Carl Roth, Karlsruhe, D
Nonadekan	k.A.	Carl Roth, Karlsruhe, D
Oktacosan	≥ 98 %	Carl Roth, Karlsruhe, D

## Material und Methoden

Bezeichnung	Reinheit	Hersteller
Pentadekan	k.A.	Carl Roth, Karlsruhe, D
Phosphoenolpyruvat Kaliumsalz	99.0 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Polypropylenglycol P 1'200		Fluka, Freiburg, D
Pyridin	≥ 99.5 %	Carl Roth, Karlsruhe, D
Ribitol	≥ 99 %	Carl Roth, Karlsruhe, D
Rotitherm K+H		Carl Roth, Karlsruhe, D
Salzsäure	37.0 %	Honeywell, Seelze, D
Seduheptulose-7-phosphat		Glycoteam GmbH, Hamburg, D
Schwefelsäure	≥ 95 %	Carl Roth, Karlsruhe, D
Trypton / Pepton aus Casein		Carl Roth, Karlsruhe, D
Urea	≥ 99.7%	Carl Roth, Karlsruhe, D
Vanadium(IV)oxidsulfat	≥ 99.99 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Xylulose-5-phosphat Natriumsalz		Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Zinksulfat Heptahydrat	≥ 99.5 %	Carl Roth, Karlsruhe, D
Zitronensäure	≥ 99.5 %	Carl Roth, Karlsruhe, D

**Tab 2.** Herstellerliste der verwendeten Kits

Kit	Hersteller
D-Glucose Test	R-Biopharm AG, Darmstadt, D
Essigsäure Test	R-Biopharm AG, Darmstadt, D
Sulfat Assay (DSFT-200)	Bioassays Systems, Hayward USA

**Tab 3.** Herstellerliste der verwendeten Geräte

Geräte	Hersteller
<b>Autoklaven</b>	
Varioklav Dampfsterilisator 135 S	H+P Labortechnik, Oberschleißheim, D
Varioklav Dampfsterilisator 25T	H + P Labortechnik, Oberschleißheim, D
<b>Bioreaktoren</b>	
Biostat Bplus 5 L MO	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, D



Geräte	Hersteller
BCP-O <sub>2</sub>	BlueSens, Herten, D
BCP-CO <sub>2</sub>	BlueSens, Herten, D
Easyferm plus K8 325	Hamilton, Bonaduz, CH
Frigomix 1000	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, D
Oxyferm™ O <sub>2</sub> Sensor	Hamilton, Bonaduz, CH
<b>GC-System</b>	
Trace GC Ultra GC	Thermo Electron (Finnigan), Dreieich, D
<b>Massenspektrometer</b>	
Trace MS (EI/CI-Quadrupol-MS)	Thermo Electron (Finnigan), Dreieich, D
<b>Mikroskop</b>	
Axio Scope	Carl Zeiss GmbH, Jena, D
<b>Konzentrator</b>	
SpeedVac Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg, D
<b>Schüttler</b>	
Schüttelwasserbad SW20	Julabo, Seelbach, D
Thermotron	Infors AG, Bottmingen, CH
Certomat BS-1 (Orbit: 50 mm)	Sartorius Biotech, Göttingen, D
<b>Ultraschallbad</b>	
Sonorex Digitec DT 255H	Bandelin Electronic, Berlin, D
<b>Waagen</b>	
Adventurer Pro AV2102C	Ohaus, Gießen, D
Discovery DV214C	Ohaus, Gießen, D
<b>Zentrifugen</b>	
Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg, D
Centrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg, D
<b>Sonstiges</b>	
Arium 611 VF	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, D
Big Squid Ikamag IKAmäleon	IKA, Staufen, D
Endos AF80	Scotsman Ice Systems, Milan, I
inoLab pH 720	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim, D

## Material und Methoden

Geräte	Hersteller
Laboport SCC840	KNF Neuberger, Freiburg, D
MixMate	Eppendorf, Hamburg, D
Sanyo MDF-U53V -86°C	Ewald Innovationstechnik, Nenndorf, D
Sicherheitswerkbank HERAsafe KS 12	Fisher Scientific, Schwerte, D
Spektralphotometer Genesys 6	Sysmex Digitana, Horgen, D
Standard Heizblock	VWR International, Darmstadt, D
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg, D
Vortexer VV3	VWR International, Darmstadt, D

**Tab 4.** Herstellerliste der verwendeten Materialien

Materialien	Hersteller
<b>Filter</b>	
Midisart 2000 (0,2 µm)	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, D
Minisart-RC SRP	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, D
Nitrocellulosefilter MCE-MF, 0,22 µm	Millipore, Schwalbach, D
Sartoflour 300 (0,2 µm)	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, D
<b>GC-Säule</b>	
DB-5MS 30 m · 0,25 mm · 0,25 µm	Agilent (J & W Scientific), Folsom, USA
<b>GC-Liner</b>	
Restek Trace 2000 Liner (2 · 2,75 · 120) mm	Restek, Bad Homburg, D
<b>Küvetten</b>	
Rotilabo Einmal-Küvetten (Polystyrol, Halbmikro, 2,5 mL)	Carl Roth, Karlsruhe, D
<b>Pipetten</b>	
Eppendorf Research (10 µL 100 µL, 1000 µL, 5 mL, 10 mL)	Eppendorf, Hamburg, D
<b>Sonstige Materialien</b>	
24 Port Vacuum Manifold	keine Angabe
Bechergläser (20 mL, 50 mL, 100 mL, 250mL, 500mL, 1000mL, 200mL)	VWR International, Darmstadt, D

Materialien	Hersteller
CLR Target DP I-D Vial (2 mL)	Thermo Scientific, Dreieich, D
Combitips und Adapter, 50 mL	Eppendorf, Hamburg, D
Filternutschen, 30 mL	keine Angabe
Falcongefäße (15 mL, 50 mL)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D
Glaswolle	Restek, Bad Homburg, D
Glasflaschen mit Schraubverschluss	Schott, Mainz, D
Langhalskolben	W. O. Schmidt Laboratoriumsbedarf, Braunschweig, D
Microeinsatz G30s	CS-Chromatographie, Langerwehe, D
Parafilm	American National Can Company, USA
Pipettenspitzen (10 µL 200 µL, 1000 µl, 5 mL, 10 mL)	Eppendorf, Hamburg, D
Reaktionsgefäße, 1,5 mL; 2 mL	Brand, Wertheim, D; Eppendorf, Hamburg, D
Schläuche (Silikon, Norprene, Pharmed, Tygon)	H. Faust GmbH, Meckenheim, D
Schraubenkappen 8-SCJ	Chromacol, Herts, UK, Kupfer Pfungstadt, D
Septen, 8 ST 101	Chromacol, Herts, UK, Kupfer Pfungstadt,
Spritzen, steril (2mL, 10 mL, 50 mL)	Terumo Europe, Leuven, B
Zählkammer (Thoma) Superior	Marienfeld, Lauda-Königshofen, D

## 2.2 Software und Bibliotheken

**Tab 5.** Liste der verwendeten Software

Software	Beschreibung
AMDIS 32, Version 2.64	Automatische qualitative und quantitative Auswertung von GC-MS Daten
Excel 2007, Microsoft	Tabellenkalkulation und Auswertung
Experiment Documentation	Dokumentationsprogramm der AG Schomburg

## Material und Methoden

Software	Beschreibung
itool	Zusatzsoftware für die Auswertung von GC-MS-Daten
MFCS win	Fermenter-Software zur Datenerfassung
Metabolite Detector	Automatische qualitative und quantitative Auswertung von GC-MS-Daten
Open Office Calc, Sun	Tabellenkalkulation und Auswertung
Open Office Writer	Textverarbeitungsprogramm
Processing4_3	Zusatzsoftware für die Auswertung von GC-MS-Daten
Scatter Plot beta 7	Excel-Makro zur Erstellung von Scatterplots
TigrMev	Visualisierung von GC-MS-Daten
translation_file_4_0_0	Zusatzsoftware für die Auswertung von GC-MS-Daten
Xcalibur 1.4, Thermo	Auswertung von GC-MS Daten

**Tab 6.** Liste der verwendeten Bibliotheken

Datenbank	Beschreibung
BRENDA	Enzymdatenbank
Enzyme Detector	Enzymdatenbank
Golm Metabolome Database	Massenspektrenbibliothek
KEGG Encyclopedia	Sammlung von Stoffwechselwegen
Library, Version 3.4.0	Massenspektrenbibliothek der AG Schomburg
Library, Version 4.0.1_unknowns	Massenspektrenbibliothek der AG Schomburg
MetaCyc	Sammlung von Stoffwechselwegen
NIST <i>Mass Spectral Database</i>	Massenspektrenbibliothek
PubMed	Literaturrecherche

## 2.3 Verwendete Organismenstämme

**Tab 7.** Liste der verwendeten Organismen

Stamm	Herkunft	Referenz
<i>Sulfolobus solfataricus</i> P2 1617	DSMZ, Braunschweig, D	Zillig et al., 1980
<i>Sulfolobus solfataricus</i> PBL 2025	Universität Marburg, D	Albers et al., 2007
<i>Sulfolobus solfataricus</i> PBL 2025ΔSSO3195	Universität Marburg, D	Albers, unveröffentlicht

## 2.4 Medien, Puffer und Lösungen

### *Sulfolobus* Komplex-Medium

Hefeextrakt	2 g
Kaliumdihydrogenphosphat	3.1 g
Ammoniumsulfat	2.5 g
Magnesiumsulfat Heptahydrat	0.2 g
Calciumchlorid Dihydrat	0.25 g

Die Substanzen wurden in 0.9 L ddH<sub>2</sub>O gelöst und der pH-Wert mit 50 %iger Schwefelsäure (v/v) auf 3.5 eingestellt. Anschließend wurde mit ddH<sub>2</sub>O auf 1 L aufgefüllt und autoklaviert.

### Grundstocklösung für das *Sulfolobus* Minimalmedium

Ammoniumsulfat	1.3 g
Kaliumdihydrogenphosphat	0.28 g
Magnesiumsulfat Heptahydrat	0.25 g
Calciumchlorid Dihydrat	0.07 g

Die Substanzen wurden in 0.9 L ddH<sub>2</sub>O gelöst und der pH-Wert mit 50 %iger Schwefelsäure (v/v) auf 3.5 eingestellt. Anschließend mit ddH<sub>2</sub>O auf 0.981 L aufgefüllt und autoklaviert.

**Spurensalze für das *Sulfolobus* Minimalmedium (1000 fach)**

MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	1.8 g
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> x 10 H <sub>2</sub> O	4.5 g
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0.22 g
CuCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0.06 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0.03 g
VO <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0.03 g
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0.01 g

Die Substanzen wurden in 0.9 L ddH<sub>2</sub>O gelöst und der pH-Wert mit 50 %iger Schwefelsäure (v/v) auf 1 eingestellt. Anschließend wurde mit ddH<sub>2</sub>O auf 1 L aufgefüllt und sterilfiltriert. Die Lösung wurde lichtgeschützt in einer braunen Flasche bei Raumtemperatur gelagert.

**Eisensulfat-Stocklösung für das *Sulfolobus* Minimalmedium (100 fach)**

0.28 g Eisensulfat wurden in 0.09 L ddH<sub>2</sub>O gelöst, auf 0.1 L aufgefüllt und sterilfiltriert. Die Lösung wurde lichtgeschützt in einer braunen Flasche bei Raumtemperatur gelagert.

**Glucose-Stocklösung (25 fach)**

550 g α-D(+)-Glucose Monohydrat wurden in 0.6 L ddH<sub>2</sub>O gelöst, auf 1 L aufgefüllt und anschließend sterilfiltriert.

**Minimalmedium für *S. solfataricus***

**Tab 8.** Pipettierschema für verschiedene Gesamtvolumina des Minimalmediums

Komponenten	Volumina für 0.2 L	Volumina für 0.1 L	Volumina für 3 L
Grundstocklösung	19.62 mL	98.1 mL	2943 mL
Glucose-Stocklösung	0.16 mL	0.8 mL	24 mL
Eisensulfat-Stocklösung	0.2 mL	1 mL	30 mL
Spurensalz-Stocklösung	0.02 mL	0.1 mL	3 mL

Das Minimalmedium wurde frisch zusammenpipettiert und umgehend verwendet.

**25 %ige Glycerin-Lösung zur Langzeit-Lagerung von Organismen**

Komponenten	Volumina für 20 mL Glycerin-Lösung
Glycerin	5.0 mL
Grundstocklösung	14.835 mL
Eisensulfat-Stocklösung	0.15 mL
Spurensalz-Stocklösung	0.015 mL

Die Glycerin-Lösung wurde vor dem Gebrauch mit sterilen Lösungen frisch zusammenpipettiert.

**Ribitol-Stocklösung**

0.05 g Ribitol wurde in 0.2 L ddH<sub>2</sub>O gelöst und auf 0.25 L aufgefüllt. Anschließend wurde die Lösung sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20 °C bis zur Benutzung gelagert.

**Methanol-Ribitol-Lösung**

Ribitol-Stocklösung	0.4 mL
Methanol	10.0 mL

Die Lösungen wurden kurz vor Gebrauch gemischt.

**Natriumchlorid-Lösung**

Natriumchlorid (0.9 % w/v)                      9 g/L

Die Lösung wurde mit ddH<sub>2</sub>O angesetzt.

**Methoxyamin-Pyridin-Lösung**

Methoxyamin Hydrochlorid	20 mg
Pyridin	1 mL

Die Lösung wurde kurz vor Gebrauch frisch angesetzt.

### Alkanzeitstandardlösung

Dekan	17.12 mg
Dodekan	16.67 mg
Pentadekan	16.23 mg
Nonadekan	12.50 mg
Docosan	12.50 mg
Octacosan	12.50 mg
Dotriacontan	12.50 mg
Hexatriacontan	12.50 mg

Die Substanzen wurden in 20 mL Cyclohexan gelöst und auf ein Gesamtvolumen von 25 mL aufgefüllt.

### 40 %ige Ethanol-Quenchlösung

0.4 L Ethanol wurden mit 0.6 L 0.9 %iger Natriumchloridlösung gemischt und bei -20 °C bzw. 4 °C gelagert.

### 60 %ige Methanol-Quenchlösung

0.6 L Methanol wurde mit 0.4 L ddH<sub>2</sub>O gemischt und bei -80 °C gelagert.

### Schwefelsäure

1 L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (c = 0.5 mol · L<sup>-1</sup>)

103.2 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (95 %) wurden mit 896.8 mL ddH<sub>2</sub>O gemischt.

1 L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (c = 3 mol · L<sup>-1</sup>)

309.6 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (95 %) wurden mit 693.1 mL ddH<sub>2</sub>O gemischt.

### Natronlauge

1 L NaOH (c = 1 mol · L<sup>-1</sup>)

40 g NaOH wurden in 800 mL ddH<sub>2</sub>O gelöst und auf 1 L aufgefüllt.

1 L NaOH (c = 3 mol · L<sup>-1</sup>)

120 g NaOH wurden in 800 mL ddH<sub>2</sub>O gelöst und auf 1 L aufgefüllt.



## 2.5 Mikrobiologische Techniken

### 2.5.1 Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte einer Bakterienkultur wurde durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Bei Trübungsmessungen besteht ein linearer Zusammenhang zwischen Zelldichte und optischer Dichte. Dieser ist jedoch nur im Bereich von etwa 0.05 bis 0.5 gegeben, deshalb wurden die Proben bei optischen Dichten über 0.5 verdünnt gemessen.

### 2.5.2 Kultivierungsbedingungen

#### 2.5.2.1 Lagerung von Mikroorganismen

Alle *S. solfataricus*-Stämme wurden in Form von Glycerinstocks bei -80 °C langfristig gelagert. Aufgrund der allgemein hohen Mutationsrate von *S. solfataricus* (She et al., 2001) wurde der frisch erworbene Stamm zunächst nach Anleitung der DSM in Komplexmedium kultiviert. Bei Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase wurden zwei Kolben mit 100 mL Minimalmedium mit je 2 mL der Vorkultur angeimpft. Aus diesen beiden Kulturen wurden Glycerinstocks hergestellt, indem sie zunächst auf vier 50 mL-Falcongefäße aufgeteilt wurden. Die Zellen befanden sich dabei in der exponentiellen Wachstumsphase ( $OD_{600} = \text{ca. } 0.8$ ). Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 3904 g und 20 °C für 10 min. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in jeweils 5 mL Glycerin-Lösung (2.4) resuspendiert. Die Suspensionen wurden vollständig auf Schraubreaktionsgefäße in 200 µL Aliquots aufgeteilt und bei -80 °C eingefroren.

#### 2.5.2.2 Kultivierung im Schüttelkolben

*S. solfataricus*-Kulturen wurden für alle Anwendungen in Minimalmedium (2.4) angesetzt. Dazu wurde das gewünschte Volumen in speziell angefertigten Langhalskolben frisch angesetzt und bei 80 °C für mindestens 30 min im Thermotron-Schüttler vorgewärmt. Die Vorwärmung war nötig, um eine zu lange lag-Phase zu vermeiden. Anschließend wurde ein 200 µL-Glycerinstock aufgetaut und komplett in das heiße Medium pipettiert. Da die Zellen bereits in Minimalmedium gelagert wurden und somit keine Adaptation an ein anderes Medium nötig war, konnte hier auf die Vorkultivierung verzichtet werden. Jede

Kultur wurde mit einer reproduzierbaren Zellmenge angeimpft, die Start-OD lag bei 0.02. *S. solfataricus* wurde unter Optimalbedingungen bei 80 °C und 160 rpm im Thermotron-Schüttler kultiviert. Als C-Quelle wurde ausschließlich Glucose verwendet. Die Zellen wuchsen innerhalb von 96 h bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.9 in der exponentiellen Phase. Zur Erstellung von Wachstumskurven wurden alle 4 Stunden Proben entnommen und die optische Dichte bestimmt. Alternativ wurde auch bei Temperaturen von 65 °C und 70 °C kultiviert. Dementsprechend erfolgte die Vorwärmung der Kulturen bei 65 °C bzw. 70 °C.

### 2.5.3 Bestimmung der Biotrockenmasse

Für die Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM) von *S. solfataricus* wurden Membranfilter aus Nitrozellulose (MCE-MF) mit einer Porengröße von 0.22 µm verwendet. Die Filter wurden zunächst 3 Tage bei 80 °C getrocknet, um Gewichtskonstanz zu gewährleisten. Das benötigte Zellmaterial wurde einer 200 mL Kultur gegen Ende der exponentiellen Phase entnommen. Aufgrund des langsamen Wachstums von *S. solfataricus* wurden Proben lediglich in einem Zeitraum von einer Stunde genommen. Um dennoch ein breites Spektrum an BTM-Messwerten bedienen zu können, wurden die Proben verdünnt oder nach der Zentrifugation in einem reduzierten Volumen resuspendiert. Für einen BTM-Wert wurden 30 mL der Kultur in ein 50 mL Falcongefäß gefüllt und bei 3904 g und 20 °C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zunächst in 35 mL 0.9 %iger NaCl-Lösung resuspendiert. Anschließend wurde die Zelldichte bestimmt und jeweils 3 x 10 mL der Kultur in 75 mL-Filternutschen auf einem 24-Port-Manifold gefüllt. Die Zellen wurden so mittels Unterdruck (ca. 200 mbar) von der NaCl-Lösung separiert und blieben vollständig auf dem Filter zurück. Die Filter wurden für 48 h bei 80 °C getrocknet und das Gewicht des Filters erneut bestimmt. Die Gewichts Differenz wurde zwischen leeren und vollen Filtern bestimmt und auf ein Volumen von 1 L umgerechnet. Diese ermittelte Konzentration der Biotrockenmasse wurde mit der optischen Dichte der Zellsuspension bei einer Wellenlänge von 600 nm zum Probeentnahmezeitpunkt korreliert.

### 2.5.4 Berechnungsformeln für die spezifische Wachstumsrate und Verdopplungszeit

Der Zuwachs an Biotrockenmasse *BTM* zu einem Zeitpunkt *t* der Wachstumsphase wird beschrieben durch:

$$\frac{dBTM}{dt} = \mu \cdot BTM_0 \quad (2.1)$$

mit:  $dBTM/dt$  = Änderung der Biotrockenmasse mit der Zeit

$BTM$  = Biotrockenmasse (in g/L)

$\mu$  = spezifische Wachstumsrate (in  $h^{-1}$ )

integriert über einen Zeitraum von  $t_0$  bis  $t_i$  ergibt sich unter Verwendung des natürlichen Logarithmus:

$$\ln(BTM_i) = \ln(BTM_0) + \mu(t - t_0) \quad (2.2)$$

Will man aus einem gemessenen Zuwachs die Wachstumsrate bestimmen, kann die logarithmische Form der Gleichung folgendermaßen umgeformt werden:

$$\mu(h^{-1}) = \frac{\ln(BTM_i) / BTM_0}{t - t_0} = \frac{\ln(BTM_i) - \ln(BTM_0)}{t - t_0} \quad (2.3)$$

Die spezifische Wachstumsrate wird in der Einheit  $h^{-1}$  angegeben. Die graphische Bestimmung der maximalen spezifischen Wachstumsrate wurde durch die Steigung der Regressionsgeraden in einer halblogarithmischen Auftragung der Zeit gegen den natürlichen Logarithmus der Biotrockenmasse bestimmt.

Für die Verdopplungszeit  $t_d$  gilt:

$$t_d(h) = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (2.4)$$

mit:  $t_d$  = Verdopplungszeit (in h)

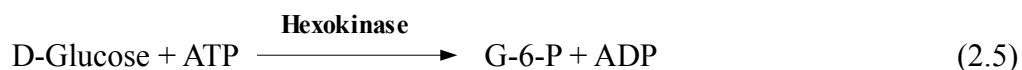
Die Verdopplungszeit wird in der Einheit h angegeben.

## 2.5.5 Quantifizierung des eingebauten Kohlenstoffs in die Biomasse

Mit dem Schwerpunkt auf dem Kohlenhydratstoffwechsel sind in diesem Projekt Kenntnisse über die Kohlenstoffbilanz während einer Kultivierung auf Glucose von großer Bedeutung. Mögliche Unterschiede der Bilanz bei Temperaturvariationen können zusätzlich zum Metabolomprofil Aufschluss über Anpassungsstrategien der Zellen geben. Für eine vollständige Bilanzierung sind Angaben zur Biotrockenmassezunahme, prozentualen Kohlenstoffanteil in der Biomasse des Organismus, Glucoseverbrauch, CO<sub>2</sub>-Abgabe und eventuelle Sekretion von C-haltigen Verbindungen voraussetzend. Die Erfassung der CO<sub>2</sub>-Abgabe war aufgrund technischer Probleme nicht möglich und laut Literatur kommt eine Sekretion C-haltiger Verbindungen bei *S. solfataricus* nicht vor. Aus diesen Gründen beschränkt sich die Berechnung auf die Korrelation zwischen Biotrockenmassezunahme und Glucoseabnahme im Kulturmedium.

### 2.5.5.1 Bestimmung der Glucosekonzentration im Medium

Zur genauen Bestimmung der Glucosekonzentration im Zellüberstand wurde das D-Glucose-Kit von R-Biopharm verwendet, welches nach dem Prinzip der UV-Methode funktioniert. Als Endprodukt zweier aufeinanderfolgender chemischer Reaktionen wird die Entstehung des Coenzym NADPH, dessen Menge äquivalent zu der Glucosemenge in der Probe ist, photometrisch bei 340 nm erfasst.



Die Fermentationsproben wurden zunächst für 10 min bei 4 °C und 10.000 g zentrifugiert, um einen klaren, zellfreien Überstand zu erhalten. Anschließend wurden die Proben so verdünnt, dass die Glucosekonzentration im Ansatz zwischen 0.08 und 0.5 g/L lag. Für *S. solfataricus*-Proben, welche höchstens eine Glucosekonzentration von 4 g/L hatten, wurde mit 1:10-Verdünnungen gearbeitet. Der Messansatz wurde nach Angaben des Kits, jedoch mit jeweils der Hälfte der angegebenen Mengen, zusammengemischt.

Die in der Probe vorhandene Glucosekonzentration konnte anschließend über die folgende

Formel, unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors, berechnet werden:

$$c = \frac{V \cdot MW}{\varepsilon \cdot d \cdot v \cdot 1000} \cdot \Delta E \text{ [g/L]} \quad (2.7)$$

#### 2.5.5.2 Korrelation von Glucoseverbrauch und Biotrockenmassezuwachs

Um den aus der Glucose eingebauten Kohlenstoff in die Biomasse quantitativ zu erfassen, wurden die pro Zeitpunkt experimentell ermittelten Werte für die Biotrockenmasse (**Kap. 2.5.3**) und Glucosekonzentration im Medium (**Kap. 2.5.5.1**) auf die Gesamtmenge, in dem Fall 3 L Kulturmedium, umgerechnet:

$$c(\text{Glucose}) \cdot V = m(\text{Glucose}) \text{ bzw. } c(\text{BTM}) \cdot V = m(\text{BTM}) \quad (2.8)$$

Der Kohlenstoff-Anteil in 1 g Glucose wird wie folgt berechnet:

$$1 \text{ g Glucose} \cdot 72/180.16 = 0.3996 \text{ g C} \quad (2.9)$$

180.16 = Molekulargewicht von Glucose

72 = Molekulargewicht des Kohlenstoffs in Glucose

Der C-Anteil in der Biomasse in Mikroorganismen wird in der Literatur mit 47.87 % angegeben (Nielsen und Villadsen, 1994):

$$1 \text{ g BTM} = 0.4787 \text{ g C} \quad (2.10)$$

Der in der Biotrockenmasse und Glucose enthaltene C-Anteil wurde mittels oben aufgeführter Formeln (**2.9** und **2.10**) pro Zeitpunkt berechnet. Nun wurde ein bestimmter Zeitraum (Zeitpunkt  $t_1$ - $t_2$ ) ausgewählt, z.B. innerhalb der exponentiellen Phase, und die Differenz des verbrauchten Glucose-Kohlenstoffs ins Verhältnis zum Kohlenstoff des Biomassezuwachses gesetzt:

$$C[\text{Glucose}] / C[\text{BTM}] = \frac{t_1 C[\text{Glucose}] - t_2 C[\text{Glucose}]}{t_2 C[\text{BTM}] - t_1 C[\text{BTM}]} \quad (2.11)$$

Das Verhältnis wurde in % angegeben:

$$\text{Einbau C[Glucose] in BTM in \%} = \frac{C[BTM] \cdot 100}{C[Glucose]} \quad (2.12)$$

## 2.6 Kultivierung im Bioreaktor

Um eine präzise Kontrolle verschiedener Kultivierungsbedingungen wie pH-Wert, Sauerstoffeintrag und Temperatur zu erreichen, wurde ein *scale up* von 0.1 L im Schüttelkolben auf 3 L in einem 5 L-Bioreaktor etabliert. Das Ziel eines größeren Kulturvolumens war außerdem im Rahmen des SulfoSys-Projekts von Bedeutung, da mit der Aufgabe der zentralen Fermentationsstelle Zellmaterial für alle Kooperationspartner kultiviert wurde. Für jedes Experiment wurde insgesamt 1.2 L Zellkultur benötigt.

### 2.6.1 Vorbereitung und Kalibrierung des Systems

Für eine Kultivierung in 3 L Medium wurde zunächst die Grundstocklösung für dieses Endvolumen frisch angesetzt. Zur automatischen pH-Kontrolle wurden Natronlauge ( $c = 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) und Schwefelsäure ( $c = 0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) in den dafür vorgesehenen Säure- und Baseflaschen angesetzt. Der Temperier-Doppelmantel wurde vollständig mit Wasser befüllt. Die Pumpenschläuche wurden kalibriert, indem ein bestimmtes Flüssigkeitsvolumen pro Zeit gefördert wurde. Das System berechnete die spezifische Förderrate aus der Laufzeit und dem geförderten Volumen. Die pH-Elektrode wurde mithilfe von Puffern des Herstellers zweipunktkalibriert, bevor sie in den Reaktor eingeschraubt wurde. Für den acidophilen Organismus *S. solfataricus* wurde dabei der Bereich zwischen pH 4 und pH 7 für die Kalibrierung gewählt. Die  $\text{pO}_2$ -Elektrode musste für 2 h an den Verstärker angeschlossen und auf diese Weise polarisiert werden, bevor die Kalibrierung vorgenommen werden konnte. Anschließend folgte eine null-Kalibrierung, indem die Elektrode für 10 min einer reinen Stickstoffatmosphäre ausgesetzt wurde. Sämtliche Einstellungen und Kalibrierungen des Systems erfolgten über den *micro* DCU „Touch Panel“. Sterilfilter wurden am Luftzugang, am Abluftkühler, an den Säure- und Baseflaschen und an der Aufsaugspritze am Handprobennehmer angebracht. Der Reaktor

wurde vollständig abgedichtet und mit der Grundstocklösung steril autoklaviert.

Anschließend wurden Wasserzulauf- und -ablaufschläuche des Doppelmantels sowie des Abluftkühlers an die Umwälzpumpe des Temperiermoduls angeschlossen und die Regelung für die gewünschte Temperatur eingestellt. Der Temperaturfühler wurde zuvor in den Reaktor eingeführt. Die O<sub>2</sub>- und CO<sub>2</sub>-Sensoren der Abgasanalyse wurden über einen Schlauch mit dem Abluftfilter verbunden. Die Schläuche der Säure- und Baseflaschen wurden in die jeweiligen Pumpenköpfe gelegt und manuell vollständig über die Pumpen befüllt. Die pO<sub>2</sub>-Elektrode musste erneut für 2 h polarisiert werden, anschließend konnte die Steilheitskalibrierung durchgeführt werden. Vor der Kalibrierung wurde das Medium für 10 unter der höchsten im Prozess verwendeten Begasungsrate mit Luft gesättigt.

Die Sensoren der Abgasanalyse wurden per Knopfdruck automatisch kalibriert. Dabei stellte der CO<sub>2</sub>-Sensor einen exakten Wert von 0.04 % und der O<sub>2</sub>-Sensor 21 % für die frische Abluft ein. Die restlichen Medienbestandteile Glucose, Eisensulfat und Spurensalze wurden unmittelbar vor dem Animpfen des Bioreaktors über den Impfstutzen in den Reaktorkessel injiziert. Zum Schluss wurden die Regler für die pH- und pO<sub>2</sub>-Elektrode aktiviert. Zuvor mussten die Reglerparameter den gewünschten Bedingungen während des Prozesses angepasst werden, z.B. die Begrenzungen für den Arbeitsbereich der Rührergeschwindigkeit und Begasungsrate (**Tab. 9**).

### 2.6.2 Fermentationsparameter

Da bislang nur wenig Erfahrungen mit der Kultivierung von *S. solfataricus* im Bioreaktor vorlagen, erfolgten die ersten Anzuchten in Anlehnung an die in unserer Arbeitsgruppe etablierte Kultivierung des Bakteriums *Corynebacterium glutamicum* (Dissertation Frimmersdorf, 2010). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Prozess speziell für *S. solfataricus* angepasst und optimiert. Die wichtigsten Fermentationsparameter und -einstellungen für *S. solfataricus* und *C. glutamicum* werden im Folgenden aufgeführt:

**Tab. 9.** Fermentationsparameter für *S. solfataricus* und *C. glutamicum*.

Parameter	<i>S. solfataricus</i>	<i>C. glutamicum</i>
Kultivierungsvolumen [L]	3	3
pH-Wert	3.5	7.0
Optimaltemperatur	80 °C	30 °C
Begasungsrate [L/min]	0.1 - 1	1 - 5
Rührergeschwindigkeit [rpm]	100 - 300	100 - 700
pO <sub>2</sub> [%]	30 %	30 %
Kaskade für pO <sub>2</sub> -Kontrolle	Begasung→Rührer	Rührer→Begasung
Säure	0.5 mol · L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3 mol · L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Base	1 mol · L <sup>-1</sup> NaOH	3 mol · L <sup>-1</sup> NaOH
Antischaummittel	/	Polypropylenglycol

### 2.6.3 Fermentationsverlauf und Datenaufzeichnung

Für eine *S. solfataricus*-Kultivierung im Bioreaktor wurden zwei 100 mL-Vorkulturen in 500 mL-Langhalskolben bei 80 °C und 160 rpm im Thermotronschüttler kultiviert. Haben die Zellen die exponentielle Phase (ca. OD<sub>600</sub> = 0.8) erreicht, wurde das Medium im Bioreaktor mit der Kultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0.03 angeimpft. Gleichzeitig wurde die Datenaufzeichnung über die Software MFCS *win* gestartet. Alle wichtigen Parameter und der Verlauf eines Prozesses konnten so zu jeder Zeit nachverfolgt werden. Der gesamte Verlauf wurde einerseits in einem Kurvendiagramm mit manuell auswählbaren Parametern aufgezeichnet, andererseits wurden alle Werte im Zeitabstand von 5 Minuten aufgenommen und konnten im *csv*-Format oder als *Excel*-Tabelle weiterverwendet werden. Um das Zellwachstum zu überprüfen, wurden einige mL Kultur über das Ernterohr und den Handprobennehmer abgenommen und die optische Dichte extern bestimmt. Gegebenenfalls wurden Proben für Analysen des Zellüberstands eingefroren. Für die Metabolomanalyse bzw. Probenentnahme für die Kooperationspartner des SulfoSys-Projekts wurden die Kulturen bis zur exponentiellen Phase (OD<sub>600</sub> = 0.8) kultiviert. Um Wachstumskurven aufzunehmen war es von Interesse, den gesamten Verlauf bis zum Absterben der Zellen zu verfolgen.



## 2.7 Temperaturschock-Experimente

Zusätzlich zu Temperaturvergleichen bei kontinuierlichen Kultivierungstemperaturen wurden eventuelle Anpassungen des Stoffwechsels von *S. solfataricus* als Antwort auf plötzlichen Temperaturstress in Form eines Kälte- und Hitzeschocks untersucht.

### 2.7.1 Kälteschock

Das Kälteschock-Experiment wurde im Bioreaktor durchgeführt. Ziel war ein rapides Absenken der Kultivierungstemperatur von optimalen 80 °C auf 65 °C. Um das präzise und innerhalb kürzester Zeit erreichen zu können, musste der heißen Kultur kaltes Medium beigemischt werden. Die zugefügte Menge musste jedoch klein genug sein, um zu starke Verdünnungseffekte zu vermeiden. Dies wurde zuvor exemplarisch getestet und festgestellt, dass 600 mL 4 °C kaltes Minimalmedium nötig war, um 3 L Kultur von 80 °C auf 65 °C abzukühlen. Für die Metabolomanalyse wurden Proben vor und unmittelbar nach dem Kälteschock geerntet. Dabei wurde das entnommene Probenvolumen an die Verdünnung der Kultur nach dem Kälteschock angepasst und entsprechend erhöht. Die Kultur wurde nach dem Kälteschock für weitere 23 h bei 65 °C kultiviert. Weitere Proben wurden nach 10 min, 30 min, 60 min, 120 min, 4 h und 23 h geerntet. Um eine mögliche Anpassung an die kältere Umgebung auf metabolischer Ebene bewerten zu können, wurde für die GC-MS-Analyse zum Vergleich eine kontinuierliche 65 °C Kultur aufgearbeitet.

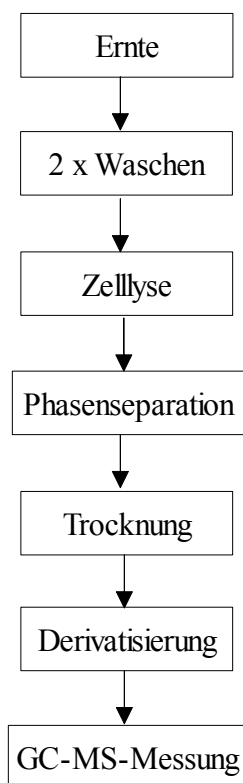
### 2.7.2 Hitzeschock

Der Hitzeschock-Versuch konnte aufgrund von Temperaturbegrenzungen des Gerätes nicht im Bioreaktor durchgeführt werden. Die Zellen wurden zunächst in Schüttelkolben bei Optimalbedingungen (80 °C) bis zur exponentiellen Wachstumsphase kultiviert. Anschließend wurden sie für eine Stunde in einen zweiten Inkubationsschüttler überführt, der auf eine Temperatur von 88 °C vorgeheizt worden war. Für die Metabolomanalyse wurden jeweils Proben vor und eine Stunde nach dem Hitzeschock geerntet.

## 2.8 Methoden für die Metabolomanalyse

### 2.8.1 Aufarbeitung der Proben

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit stand die Analyse intrazellulärer polarer Metabolite im Vordergrund. Für einige Fragestellungen, beispielsweise beim Quenching (**Kap. 2.8.2**), war außerdem die Analyse des extrazellulären Mediums von Bedeutung. Für die Extraktion intrazellulärer Stoffe werden die Proben nach einem in dieser Arbeitsgruppe etablierten Standardprotokoll aufgearbeitet (Strelkov et al., 2004). Die Vorgehensweise ist in einem Fließschema in **Abb. 11** dargestellt.



**Abb. 11** Fließschema des Standardprotokolls für die Metabolomanalyse.

Die Prozedur beginnt mit der Zellernte. Der Zeitpunkt ist je nach Organismus unterschiedlich, wurde aber stets in der Mitte oder am Ende der exponentiellen Wachstumsphase gewählt. Aus Gründen der Vergleichbarkeit musste die Zellmenge immer konstant gehalten werden. Dies wurde gewährleistet, indem das Entnahmevolumen, bezogen auf die jeweilige optische Dichte der Zellkultur, unmittelbar vor jeder Zellernte

berechnet wurde. Für Metabolomanalysen mit dem *Trace* GC-Q-MS und der unten beschriebenen Methode (**Kap. 2.8.2.1**) wurden 20 mg BTM pro Probe geerntet.

Um aussagekräftige und reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen, war es von großer Wichtigkeit, mit Replikaten zu arbeiten. Dabei wurden mindestens je 3 technische Replikate aus einer biologischen Kultur, sowie 3 biologische Replikate aus 3 Kolben, geerntet. Bei der Auswertung geben die Fehler der technischen Replikate lediglich Schwankungen bei der Aufarbeitung und Messung wieder, während mit den biologischen Replikaten zusätzlich die natürlichen Varianzen zweier Kulturen reflektiert werden. Die heiße Kultur wurde unmittelbar nach der Ernte auf 20 °C abgekühlt. Dabei wurde der Kolben kurzzeitig im Eisbad geschwenkt, bevor die Proben auf die einzelnen *Falcons* verteilt wurden. Kulturen aus dem Bioreaktor wurden dementsprechend in einen sauberen Erlenmeyerkolben überführt und gekühlt. Die Zeit betrug für 100 mL einer 80 °C-Kultur 1:30 min, für 70 °C 1:20 min und für 65 °C 1 min. Anschließend folgte die Abtrennung des Kulturmediums, indem die Proben bei 20 °C und 3904 g für 5 min zentrifugiert wurden. Die Überstände wurden entweder verworfen bzw. für die Analyse extrazellulärer Metabolite aufgehoben und die Pellets mit 0.9 %iger Natriumchlorid-Lösung (20 °C) gewaschen. Dieser Waschvorgang wurde einmal wiederholt und die resuspendierten Pellets erneut bei gleichen Bedingungen zentrifugiert und gewaschen. Anschließend wurden die Pellets in 1.5 mL Methanol-Ribitol-Lösung (**Kap. 2.4**) resuspendiert und für 15 min bei 70 °C im Ultraschallbad lysiert. Nach einer zweiminütigen Abkühlung auf Eis wurde 1.5 mL ddH<sub>2</sub>O hinzugegeben. Nachdem die Proben 1 min intensiv gemischt wurden, folgte die Zugabe von 1 mL Chloroform und eine erneute einminütige Durchmischung der Lösung. Zur Phasenseparation wurden die Proben bei 4 °C und 3904 g für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde 1 mL von der oberen polaren Phase in ein 2 mL-Reaktionsgefäß überführt und über Nacht im *Speed vac-Concentrator* vollständig getrocknet. Um einen Siedeverzug zu vermeiden, wurde das Gerät zu Beginn 1 Stunde im Rotationsmodus betrieben. Die vollständig getrockneten Proben wurden entweder mit Parafilm verschlossen und bei -20 °C bis zur Messung gelagert oder direkt im Anschluss derivatisiert.

Die Derivatisierung erfolgte in zwei Schritten. Im ersten Schritt wurde 20 µL Methoxyamin-Pyridin-Lösung zu dem getrockneten Extrakt hinzugefügt und intensiv gemischt. Dann folgte eine Inkubation in einem Thermo-Mixer bei 30 °C und 600 rpm für

90 min. Anschließend wurde 32  $\mu\text{L}$  MSTFA hinzugefügt und die Proben für 30 min bei 37 °C und 600 rpm inkubiert. Im Anschluss daran folgte eine weitere zweistündige Inkubation bei 25 °C und 600 rpm. Die derivatisierten Proben wurden für 3 min bei 10.000 g zentrifugiert und der klare Überstand in Probengläser mit Mikroeinsätzen überführt.

Für die Analyse extrazellulärer Metabolite wurden 200  $\mu\text{L}$  des Zellüberstands mit 30  $\mu\text{L}$  Ribitol-Lösung versetzt und vollständig im *Speed vac-Concentrator* getrocknet. Die Derivatisierung erfolgte wie oben beschrieben.

### 2.8.2 Quenching

Zur vollständigen Abstopfung des Metabolismus wurden mehrere Quenchingmethoden für *S. solfataricus* getestet.

#### Ethanol-Quenching

Das für mesophile Bakterien und Hefe etablierte Quenching mit Ethanol bei -20 °C (Spura et al., 2009) wurde für *S. solfataricus* bei 3 verschiedenen Temperaturen durchgeführt -20 °C, 4 °C und 20 °C. Alle Experimente begannen mit der Vorkühlung der Ethanol-Quenchlösung auf die jeweilige Temperatur. Diese wurde zuvor auf Falcongefäße aufgeteilt, und zwar entsprach das Volumen dem späteren Entnahmevolumen der Zellkultur. Da für *S. solfataricus* bei einer  $\text{OD}_{600}$  von 0.8 100 mL benötigt worden wären, musste eine Probe auf jeweils zwei Falcongefäße aufgeteilt und später wieder vereinigt werden. Beim -20 °C-Versuch wurden die 1:1-Mischungen in den *Falcons* für einige Minuten in einem -30 °C kalten Isopropanolbad auf ca. -5 °C heruntergekühlt, bevor sie bei -16 °C und 3904 g für 5 min zentrifugiert wurden. Die Zellüberstände wurden für weitere Analysen aufgehoben. Das Pellet wurde in 0.75 mL Methanol-Ribitol-Lösung resuspendiert und jeweils zwei Proben wurden wieder vereinigt. Alle darauffolgenden Schritte wurden nach Standardprotokoll (**Kap. 2.8.1**) durchgeführt. Das Ethanol-Quenching bei 4 °C und 20 °C verlief nach gleichem Protokoll wie das Quenching bei -20 °C, mit dem einzigen Unterschied, dass die Quenchlösungen, Zentrifugationsschritte und Abkühlungen im Isopropanolbad an die jeweilige Temperatur angepasst wurden.

### **Methanol-Quenching**

Beim Quenching mit Methanol (Spura et al., 2009) wurde eine 60 %ige Methanol-Quenchlösung auf Falcongefäße verteilt und auf -58 °C vorgekühlt. Nach der Ernte wurde das Probenvolumen mit der Methanol-Lösung in einem Verhältnis von 1:2 gemischt und im Isopropanolbad auf -20 °C heruntergekühlt. Anschließend wurden die Proben bei -9 °C und 10.000 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde für weitere Analysen aufgehoben. Die Pellets wurden in 0.75 mL Methanol-Ribitol-Lösung resuspendiert und nach Standardprotokoll (**Kap. 2.8.1**) weiterverarbeitet. Wie schon beim Ethanol-Quenching beschrieben, wurden jeweils zwei *S. solfataricus*-Proben beim Resuspendierschritt vereinigt.

### **2.8.3 GC-MS-Analyse**

#### **2.8.3.1 Messung der Proben**

Zur Analyse der Proben wurde ein System aus einem *Trace* Gaschromatographen gekoppelt an ein *Trace* Quadrupol-Massenspektrometer und einem AS 3000 *Autosampler* verwendet. Das System wurde über die Software *Xcalibur* (Version 1.2) gesteuert. Die Ionisierung erfolgte durch positive Elektronenionisation (EI +) bei 70 eV mit einer Quellentemperatur von 220 °C. Der Detektor hatte eine Spannung von 500 V und einen Emissionswert von 150 µA. Kalibriert wurde das System nach Anleitung des Herstellers mit Perfluorotri-N-butylamin als Referenzgas. Massenspektren wurden im *Full-scan*-Modus von  $m/z$  40 bis 460 mit einer *Scanrate* von 2.5 *scans/s* über 60 min pro Messung aufgenommen. Die Injektion erfolgte mittels eines *Programmed Temperature Vaporizers* (PTV)-Injektors im Split-Modus (*Split ratio* 1:25) mit einem 71 · 2 mm Glasliner, der manuell mit Glaswolle befüllt worden war. Für die Messungen wurden 2 µL der Probe bei einer Injektortemperatur von 70 °C eingespritzt und in 0.2 min verdampft. Die Temperatur des Injektors wurde kontinuierlich um 14 °C/s erhöht bis eine Endtemperatur von 280 °C erreicht wurde. Da die Analyten bei einer möglichst geringen Temperatur verdampft werden, eignet sich diese Methode besonders für thermolabile Substanzen. Die Chromatographie wurde mit einer 30 m langen DB 5MS Säule mit einem Innendurchmesser von 0.25 mm und einer Schichtdicke von 0.25 µm durchgeführt. Die innere Beschichtung der Säule – die sog. stationäre Phase – war mit hochviskosem Polysiloxan beschichtet, das zu 95 % aus Dimethyl- und zu 5 % mit Phenylgruppen substituiert war.

Die Ofentemperatur des Gaschromatographen, und somit die Säulentemperatur, wurde für 1 min nach der Injektion bei 70 °C gehalten, dann zunächst mit 1 °C/min auf 76 °C und anschließend mit einer Steigerungsrate von 6 °C/min auf 325 °C erhöht. Die Endtemperatur wurde für 10 min gehalten. Als Trägergas wurde Helium mit einer Flussrate von 1 mL/min eingesetzt.

Zu Beginn jeder Messreihe wurde der Zeitstandard gemessen. Diese Probe enthielt 48 µL MSTFA und 6 µL des Alkanzeitstandards (**Kap. 2.4**). Nach jeweils 3 Probendurchläufen wurde pures Cyclohexan zur Reinigung des Systems gemessen. Die Reihenfolge eines Probensatzes mit biologischen sowie technischen Replikaten wurde randomisiert gemessen, um geräteabhängige Schwankungen auszugleichen.

### 2.8.3.2 Auswertung der Messdaten

Das Ausgabeformat der *Xcalibur*-Software (*.raw*) wurde zunächst mittels *Xcalibur* in das für viele weitere Anwendungen kompatible *netCDF*-Format konvertiert. Zur Prozessierung und qualitativen sowie quantitativen Auswertung der Messdaten wurde die Software *MetaboliteDetector* (Version 2.06b) (Hiller et al., 2009) verwendet. Die Software ermöglicht die automatische Identifizierung und Quantifizierung der Substanzen anhand von Retentionsindizes und Massenspektren. Zunächst detektiert das Programm einzelne Ionenspuren eines Chromatogramms und extrahiert nach einem Dekonvolutionsschritt das jeweilige Massenspektrum jeder Substanz. Unabdingbar für eine sichere Identifizierung oder auch für Vergleiche zwischen Chromatogrammen ist die Berechnung des Retentionsindex nach Kováts (Kováts, 1958) für jede Substanz. Anhand einer separat gemessenen *n*-Alkanstandardmischung berechnet die Software die RIs automatisch für beliebig viele Chromatogramme. Die 8 Alkane sind fast gleichmäßig über den 60minütigen Chromatographielauf verteilt und somit kann für jeden Peak ein spezifischer Abstand zu einem der Alkane berechnet werden (siehe **Tab. 10**).

**Tab. 10.** Retentionszeiten und -indizes der einzelnen Alkane.

<b>Alkan</b>	<b>Kohlenstoffatome</b>	<b>Retentionsindex [RI]</b>	<b>Retentionszeit [min]</b>
Decan	10	1000	7.38
Dodecan	12	1200	13.67
Pentadecan	15	1500	20.74
Nonadecan	19	1900	28.21
Docosan	22	2200	32.95
Oktacosan	28	2800	40.87
Dotriacontan	32	3200	45.30
Hexatriacontan	36	3600	49.26

Für eine noch präzisere Berechnung kann zu der Kalibrierung der interne Standard (Ribitol), der in jeder Probe vorhanden ist, hinzugezogen werden. Dadurch können eventuelle Retentionszeitverschiebungen ausgeglichen werden. Anhand einer hinterlegten Stoffbibliothek kann die Software nun die Identifizierung mittels einer Kombination von RI und Massenspektrum durchführen. Die Bibliothek kann importiert werden oder auch mit *MetaboliteDetector* selbst erstellt werden. Trotz der automatischen Durchführbarkeit der Identifizierung und Quantifizierung ist es möglich, Ionenspuren und RIs manuell zu überprüfen und ggf. anzupassen. Auf diese Weise konnten Fehlzuordnungen der Peaks ausgeschlossen und eine erhöhte Genauigkeit der Ergebnisse erzielt werden. Neben einer *targeted*-Analyse bestand die Möglichkeit, mit einer *non-targeted*-Analyse nach reproduzierbaren unbekannten Peaks zu suchen. Im Verlauf der sog. *Batch*-Quantifizierung sucht die Software nach geeigneten Ionenspuren für die relative Quantifizierung jedes einzelnen Peaks. Diese können jedoch auch manuell definiert und hinterlegt werden. Das Programm integriert und berechnet nun die Fläche unter der ausgewählten Ionenspur. Das Ergebnis mit der Auflistung aller detektierten Komponenten und den dazugehörigen Peakflächen in jeder zum Vergleich ausgewählten Probe wird in einer Tabelle zusammengefasst dargestellt. Diese kann exportiert und mit anderen Programmen weiterbearbeitet werden. Mit dem internen Standard können weiterhin alle Peakflächen normalisiert werden. Ribitol ist in jeder Probe in gleicher Menge vorhanden, somit können mit der Division jeder Peakfläche durch die Fläche Ribitols Ungleichheiten korrigiert und die Chromatogramme verschiedener Proben vergleichbar gemacht werden. Um Fehler bei der

Auswertung aufgrund von Geräteschwankungen zu vermeiden, wurden stets nur Proben miteinander verglichen, die zusammen in einem Lauf gemessen worden waren. Die exportierte Tabelle wurde anschließend mit der Software *itool* bearbeitet, welche die einzelnen Derivate eines Metabolits aufsummiert. Zur Visualisierung der Ergebnisse wurden die Messungen in Streu- oder Balkendiagrammen logarithmisch aufgetragen. Die Graphen wurden mithilfe von *ScatterPlot beta7* erstellt.

**Tab. 11.** Verwendete *MetaboliteDetector*-Einstellungen.

Parameter	Einstellung
<b><i>RI-Kalibrierung</i></b>	
Grundlinienjustierung	ein
Peak Schwellenwert	100
Minimale Peakhöhe	9
Anzahl der Bins/Scan	10
Dekonvolutionsweite	8
<b><i>Erweiterte Kalibrierung</i></b>	
Interner Standard	Ribitol-5-TMS
Erforderlicher Score	0.75
<b><i>Batch-Quantifizierung</i></b>	
Maximale RI-Differenz	15
Reinheit	0.5
Scoring-Methode	RI + Spektrum
Minimaler Score	0.7
Reproduzierbarkeit der Verbindungen	0.5
Erforderlicher Signal-to-Noise-Wert	8
Maximaler Peak Discrimination Index	100
Minimale Ionenanzahl	20

### 2.8.3.3 Chemometrische Datenanalyse und Statistik

#### **Berechnung des arithmetrischen Mittels**

Aus einer Reihe von  $n$  verschiedenen Messungen einer Messreihe wurde das arithmetische Mittel aller Messwerte berechnet. Der *Mittelwert*  $\bar{x}$  stellt den wahrscheinlichsten Wert



der Messreihe dar.

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (2.13)$$

Der mittlere Fehler der Einzelmessung, auch *Standardabweichung*  $s$ , ist ein Maß für die Abweichung des Einzelmesswertes  $x_i$  vom Mittelwert  $\bar{x}$ .

$$s = \pm \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (\bar{x} - x_i)^2} \quad (2.14)$$

Meist war die Genauigkeit der Einzelmessung einer Messreihe nicht von Interesse, sondern die Genauigkeit des arithmetischen Mittels. Der mittlere Fehler des Mittelwertes  $s_{\bar{x}}$  ist um den Faktor  $1/\sqrt{n}$  kleiner als die Standardabweichung  $s$  und gibt das Intervall um den Mittelwert herum an, indem der wahre Wert einer Größe  $x$  erwartet werden kann.

$$s_{\bar{x}} = \pm \sqrt{\frac{1}{n(n-1)} \sum_{i=1}^n (\bar{x} - x_i)^2} = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (2.15)$$

Dabei wurde immer vorausgesetzt, dass alle Messresultate  $x_i$  voneinander unabhängig waren und gleiche Genauigkeit aufwiesen. Aus der Angabe des *relativen Fehlers*  $s_{rel}$  ließ sich die Präzision eines Messverfahrens unmittelbar ablesen.

$$s_{rel} = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (2.16)$$

## Statistik

Die chemometrische Datenanalyse wurde mit der Software *TigrMev* unterstützt. Mittels Hauptkomponentenanalysen (PCA, *Principal Component Analysis*) konnten Gruppierungen (Clusterungen) der hochdimensionalen Daten visualisiert werden. Die PCA dient der Strukturierung, Vereinfachung und Veranschaulichung umfangreicher Datensätze. Der Vergleich vieler variierender Metabolomproben beinhaltet meist eine Vielzahl von

Variablen, welche durch eine geringere Zahl möglichst aussagekräftiger Linearkombinationen genähert werden können. Dabei werden die Datensätze in einem multidimensionalen Raum angeordnet, so dass die erste Dimension bzw. Hauptkomponente die größten Varianzen innerhalb des Datensatzes repräsentiert, die zweite Hauptkomponente den zweitgrößten Anteil, usw. Die Richtungen mit der größten Streuung (Varianz) beinhalten die meiste Information. Eine repräsentative signifikante Varianz zwischen zwei Proben sollte mindestens 50 % betragen.

Der t-Test wurde verwendet, um zu überprüfen, ob die Metabolitkonzentrationen zweier biologischer Zustände signifikant voneinander abweichen. Dabei wird ausgeschlossen, dass beobachtete Unterschiede zwischen den Mittelwerten zufällig entstanden sind. Der hier verwendete Zweistichproben-t-Test setzt Normalverteilung voraus. Anhand der Mittelwerte zweier Stichproben wird berechnet, ob die Erwartungswerte zweier Grundgesamtheiten einander gleich sind oder ob einer der Mittelwerte kleiner ist als der andere. Bei der Durchführung des t-Tests wurde das Signifikanzniveau  $\alpha = 5 \%$  gewählt.

### 3 Ergebnisse

Im ersten Teil der Arbeit wurden die Kultivierungsbedingungen etabliert und einige wichtige mikrobiologische Parameter für *Sulfolobus solfataricus* bestimmt. Veränderungen im Wachstum bei den für die späteren Vergleiche des Metaboloms verwendeten Temperaturen wurden anhand von Wachstumskurven belegt. Die Aufarbeitungsmethode für die GC-MS-Analyse wurde anhand des Standardprotokolls von *Corynebacterium glutamicum* für *S. solfataricus* angepasst. Die Zellanzucht in einem 5 L-Bioreaktor wurde etabliert und ein *scale up* von 0.1 auf 3 L erzielt.

Im zweiten Teil der Arbeit konnten erste Metabolomdaten erzeugt werden. Anhand des metabolischen Profils erfolgte zunächst eine Charakterisierung von *S. solfataricus* im Vergleich zu vorhandenen metabolischen Profilen anderer Mikroorganismen. Anschließend wurden Vergleiche des Metaboloms bei Variation der Wachstumstemperatur durchgeführt. Neben der kontinuierlichen Kultivierung bei Temperaturen unterhalb des Optimums wurde der Organismus auch plötzlichen Temperaturänderungen ausgesetzt. Um eventuell weitreichendere Einblicke in die Anpassung des Stoffwechsels zu erlangen, wurden zusätzlich Metabolomanalysen einer *knock out*-Mutante, welche eine Deletion im Zentralstoffwechsel aufweist, durchgeführt.

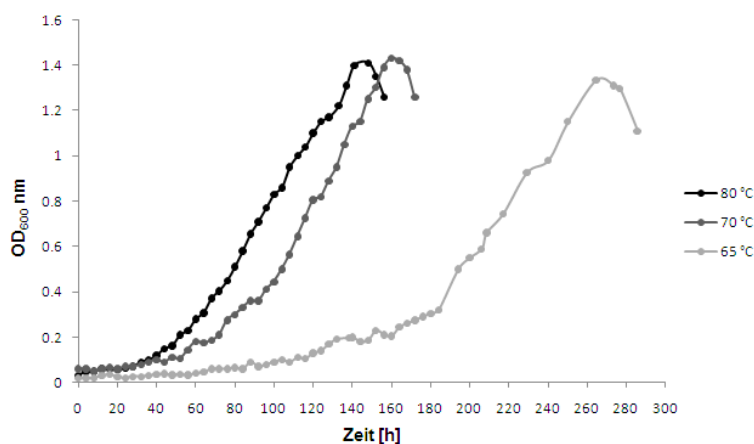
#### 3.1 Etablierung der Wachstumsbedingungen und Bestimmung mikrobiologischer Parameter

Für eine reproduzierbare und verlässliche Metabolomanalyse von Mikroorganismen ist es bei Versuchswiederholungen sehr wichtig, während einer Kultivierung alle Parameter konstant zu halten. In Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich Glucose als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle in einem spezifisch für *S. solfataricus* definierten Minimalmedium (siehe **Kap. 2.4**) verwendet. Ausnahme war die Erstkultivierung des Organismus nach Erwerb des Stammes von der DSMZ, die in Komplexmedium stattfand. Der einzige variierende Parameter während späterer Kultivierungen war die Temperatur. Zunächst wurden Wachstumskurven im Schüttelkolben bei verschiedenen Temperaturen

aufgenommen und wichtige mikrobiologische Kenngrößen wie Biotrockenmasse, spezifische Wachstumsrate und Verdopplungszeit bestimmt. Darüber hinaus wurde der Einbau des Kohlenstoffs in die Biomasse ermittelt, indem der Glucoseverbrauch und der Biomassezuwachs pro Zeit miteinander korreliert wurden. Neben dem Wildtyp P2 1617 wurde außerdem das Wachstum des Deletionsstammes PBL 2025 und der *knock out* Mutante PBL 2025 $\Delta$ SSO3195 charakterisiert. Die Etablierung einer Kultivierung in einem 5 L-Bioreaktor stand ebenfalls im Vordergrund der Untersuchungen.

### 3.1.1 Kultivierung des P2 1617 bei unterschiedlichen Temperaturen

*S. solfataricus* ist in der Lage auch bei weitaus niedrigeren Temperaturen als bei für ihn optimalen 80 °C zu wachsen. Die untere Temperaturspanne, in der Wachstum noch möglich ist, reicht bis ca. 60 °C. Mittels Messungen der optischen Dichte wurde das Wachstum bei unterschiedlichen Temperaturen kontrolliert. Die Kultivierung wurde in 500 mL Langhalskolben in 100 mL Minimalmedium bei 160 rpm und 80 °C, 70 °C oder 65 °C durchgeführt (siehe **Kap. 2.5.2.2**). Das Medium wurde auf die jeweilige Temperatur vorgewärmt und mit einem 200  $\mu$ L Glycerinstock (ebenfalls auf Glucose kultiviert) angeimpft. Die optische Dichte wurde alle 4 Stunden bei 600 nm gemessen.



**Abb. 12** Wachstumskurven des P2 1617 bei 80 °C, 70 °C und 65 °C. Die Versuche wurden mehrfach reproduziert und für die Darstellung jeweils die Mittelwerte berechnet.

Die Wachstumskurven in **Abb. 12** zeigen den typischen Verlauf mikrobiellen Wachstums. Nach einer *lag*-Phase mit sehr langsamem Wachstum folgt die exponentielle Phase mit der

kleinsten Verdopplungszeit, gefolgt von der stationären und der Absterbephase. Bei unterschiedlichen Kultivierungstemperaturen lassen sich Unterschiede im Wachstum feststellen. Bei seinem Temperaturoptimum von 80 °C wächst der P2-Stamm ungefähr 140 h, danach sinkt die OD abrupt ab. Bei 70 °C lässt sich ein sehr ähnlicher Kurvenverlauf beobachten, lediglich die *lag*-Phase ist verlängert im Vergleich zum Temperaturoptimum. Nach ca. 160 h beginnt bei 70 °C die Absterbephase. Bei 65 °C verlängert sich die Wachstumszeit nochmals stark und die Kurve ist flacher als bei 80 °C und 70 °C. Erst nach ungefähr 260 h stirbt der Organismus ab.

Für eine exakte Kennzeichnung des Wachstums in die *lag*-, exponentielle und stationäre Phase sowie die Berechnung der spezifischen Wachstumsrate des Organismus wurde im Folgenden die Biotrockenmasse bestimmt.

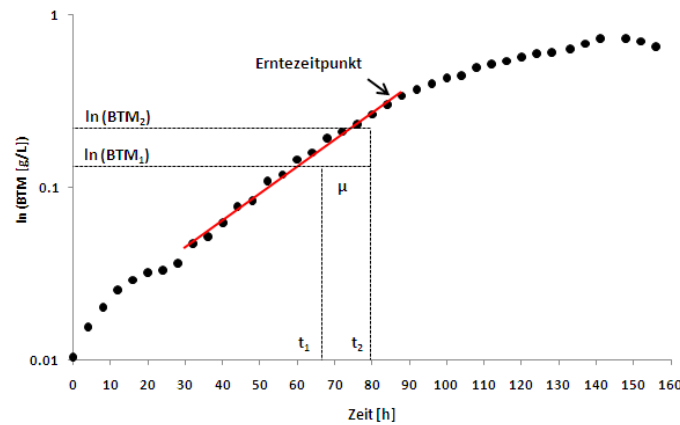
### **3.1.2 Korrelation von Biotrockenmasse und optischer Dichte**

In einem OD-Bereich von 0.1 bis 1.4 wurde die Konzentration der Biotrockenmasse mit der Methode aus **Kap. 2.5.3** bestimmt. Mittels linearer Regression konnte anschließend folgende Formel zur Berechnung der Biotrockenmasse (BTM) aus Messungen der optischen Dichte abgeleitet werden:

$$\text{BTM}_{S. solfataricus} (\text{g/L}) = 0.521 \cdot \text{OD}_{600} \quad (3.1)$$

### **3.1.3 Berechnung der spezifischen Wachstumsrate und Verdopplungszeit bei 80 °C, 70 °C und 65 °C**

Zur genauen Ermittlung der exponentiellen Wachstumsphase wurde der natürliche Logarithmus der Biotrockenmasse gegen die Zeit aufgetragen. Im Bereich der exponentiellen Phase ergibt sich durch lineare Regression eine Gerade, deren Steigung die spezifische Wachstumsrate darstellt.



**Abb. 13** Graphische Ermittlung der exponentiellen Wachstumsphase (Regressionsgerade) und der spezifischen Wachstumsrate  $\mu$  bei optimalen Bedingungen (80 °C). Der Pfeil stellt den Erntezeitpunkt für die Metabolomanalyse dar.

Die spezifische Wachstumsrate  $\mu$  entspricht der Zunahme der Biomasse pro Zeiteinheit und ist in der exponentiellen Wachstumsphase maximal (Steigungsdreieck, **Abb. 13**).

$$\mu_{80\text{ °C}} = \frac{\ln(BTM_2) - \ln(BTM_1)}{t_2 - t_1} = 0.055\text{ h}^{-1} \quad (3.2)$$

Bei einer Optimaltemperatur von 80 °C mit Glucose als C-Quelle wird eine spezifische Wachstumsrate von  $0.055\text{ h}^{-1}$  erreicht.

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} = 12.6\text{ h} \quad (3.3)$$

Die Verdopplungszeit beträgt während der exponentiellen Wachstumsphase bei 80 °C 12.6 Stunden. Der Erntezeitpunkt für die Metabolomanalyse wurde gegen Ende des exponentiellen Wachstums gewählt. Das war notwendig, um für die Aufarbeitungsprozedur ausreichend Biomasse pro Probe zu erhalten (siehe **Kap. 3.2**).

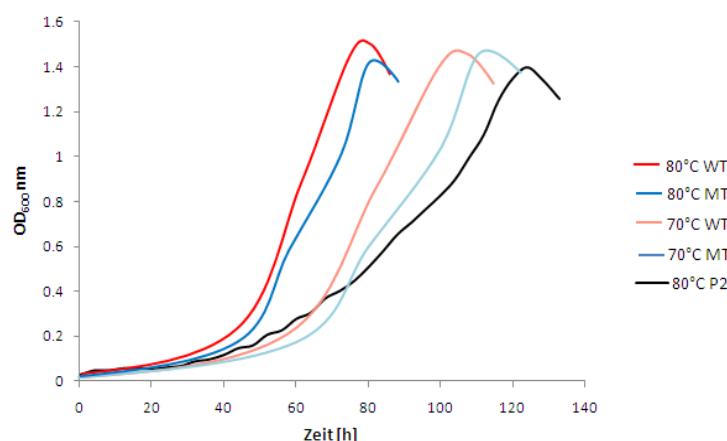
Unter der Annahme, dass Gewicht und Größe der Zellen bei Temperaturen unterhalb des Optimums mit den Werten bei 80 °C übereinstimmen, wurden für 70 °C und 65 °C folgende Werte für die spezifische Wachstumsrate und Verdopplungszeit berechnet:

Bei einer Temperatur von 70 °C wird eine spezifische Wachstumsrate von  $0.033\ h^{-1}$  erreicht. Die Verdopplungszeit beträgt 21 Stunden. Wie auch bei 80 °C wird hier der Erntezeitpunkt für die Metabolomanalyse gegen Ende des exponentiellen Wachstums gewählt.

Bei 65 °C wird eine spezifische Wachstumsrate von  $0.015\ h^{-1}$  erreicht. Die Verdopplungszeit beträgt 46.2 Stunden.

### 3.1.4 Wachstumskurven von *S. solfataricus* PBL 2025 und PBL 2025ΔSSO3195 im Vergleich zum P2 1617

Die Möglichkeit, spezifische Gene auszuschalten und somit *knock out*-Mutanten zu erzeugen bietet der *S. solfataricus*-Stamm PBL 2025, ein Abkömmling des Stammes 98/2. Der Stamm 98/2 unterscheidet sich auf genetischer Ebene kaum vom P2-Stamm, eignet sich jedoch für die Erzeugung von Mutanten besser (Haseltine et al., 1999). PBL 2025 ist eine natürliche Deletionsmutante, welcher ein chromosomaler Abschnitt von etwa 50 Genen fehlt. Darunter befinden sich Gene, die für Glycosylhydrolasen codieren, welche wiederum den Abbau von  $\beta$ -verknüpften Disacchariden katalysieren. Ein Beispiel ist das *lacS*-Gen für den Lactose-Katabolismus. Eine der ersten erfolgreich hergestellten *knock out*-Mutanten ist die PBL 2025ΔSSO3195, welcher das Gen für die KDG Kinase fehlt (Albers, unveröffentlicht). Bevor Metabolomanalysen durchgeführt werden konnten, wurden auch für den PBL-Stamm zunächst seine Wachstumseigenschaften bestimmt.



**Abb. 14** Wachstumskurven von *S. solfataricus* PBL 2025 (WT) und PBL 2025ΔSSO3195 (MT) bei 80 °C und 70 °C im Vergleich zum P2-Stamm (P2) bei 80 °C.

Sowohl der PBL 2025 als auch die knock out-Mutante PBL 2025 $\Delta$ SSO3195 wachsen schneller als der P2-Stamm. Wie in Abb. 14 zu erkennen ist, weisen beide Stämme sogar bei 70 °C eine höhere Wachstumsgeschwindigkeit auf als der P2-Stamm bei Optimaltemperatur. Dabei hat der PBL 2025 bei beiden Temperaturen eine etwas kürzere lag-Phase als der PBL 2025 $\Delta$ SSO3195 und erreicht auch früher die maximale Zelldichte. Die Kurvenverläufe sind bis auf die zeitliche Verschiebung sehr ähnlich.

Bei 80 °C erreicht der PBL 2025 eine Wachstumsrate von  $0.095\ h^{-1}$  und eine Verdopplungszeit von 7.2 h. Die Mutante ist mit einer Wachstumsrate von  $0.091\ h^{-1}$  und einer Verdopplungszeit von 7.6 h etwas langsamer. Bei 70 °C erreicht der PBL 2025 eine Wachstumsrate von  $0.07\ h^{-1}$  und eine Verdopplungszeit von 9.9 h, während die Mutante eine Wachstumsrate von  $0.067\ h^{-1}$  und eine Verdopplungszeit von 10.4 h aufweist.

### 3.1.5 Etablierung der Kultivierung im Bioreaktor

Im Rahmen des SulfoSys-Projekts war es nötig, Zellmaterial für mehrere Teilprojekte, in denen Transkriptom- und Proteomanalysen sowie Enzymtests durchgeführt wurden, bereitzustellen. Um die Ergebnisse später in einem wissenschaftlichen Kontext vereinigen zu können, wurde vorausgesetzt, dass die Zellen aus einer einzigen biologischen Kultur stammen. Aufgrund der großen benötigten Kulturmenge (ca. 1200 mL pro Gesamtexperiment) war eine Kultivierung in Schüttelkolben nicht möglich. Mittels eines 5 Liter-Bioreaktors konnte ein *Scale-up* von 100 mL auf 3 Liter erzielt werden. Weiterhin bietet ein Bioreaktor die Möglichkeit, verschiedene Kultivierungsparameter, wie z.B. Temperatur, pH-Wert und Sauerstoffeintrag, präzise kontrollieren und regulieren zu können. Das wiederum verspricht eine bessere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse als im Schüttelkolben. Der erste Ansatz bei der Kultivierung im Bioreaktor stützte sich dabei auf bereits in der Arbeitsgruppe etablierte Bioreaktor-Experimente mit *C. glutamicum* (Dissertation Frimmersdorf, 2010).



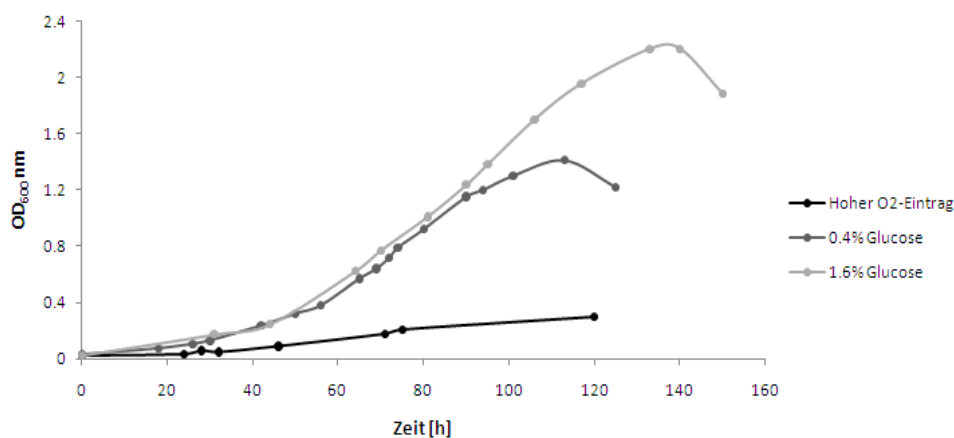
**Tab. 12** Wichtigste Änderungen eines etablierten Kultivierungsprotokolls im Bioreaktor (*C. glutamicum*) für die Kultivierung von *S. solfataricus* (grau hinterlegt).

Parameter	<i>C. glutamicum</i>	<i>S. solfataricus</i>
Kultivierungsvolumen	3 L	3 L
Start-OD	1	0.02
pH-Wert	7.0	3.5
Temperatur	30 °C	80 °C
Begasungsrate	1 – 5 L/min	0.1 – 1 L/min
Rührergeschwindigkeit	300 – 700 rpm	100 – 300 rpm
pO <sub>2</sub>	30 %	30 %
Kaskade für pO <sub>2</sub> -Kontrolle	Rührer→Begasung	Begasung→Rührer
Säure	3 mol · L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5 mol · L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Base	3 mol · L <sup>-1</sup> NaOH	1 mol · L <sup>-1</sup> NaOH
Antischaummittel	Polypropylenglycol	kein Antischaummittel

Zunächst wurden die Zusammensetzung des Kulturmediums sowie die Start-OD, ausgehend von der Kultivierung von 0.1 L im Schüttelkolben, an das größere Volumen von 3 L adaptiert. Alle anderen Kultivierungsparameter wurden Schritt für Schritt verändert und an den neuen Organismus angepasst. Anhand der Wachstumsgeschwindigkeit konnte ermittelt werden, wie gut oder schlecht sich eine Veränderung auf die Zellen auswirkt. Die Temperatur wurde konstant bei 80 °C gehalten. Der pH-Wert wurde über die Säure- und Basenpumpe reguliert und dabei konstant bei 3.5 gehalten, wobei die Molarität der Säure und Lauge von 3 mol · L<sup>-1</sup> auf 0.5 bzw. 1 mol · L<sup>-1</sup> herabgesetzt wurde. Grund dafür war die schwächere Pufferwirkung im *S. solfataricus*-Medium im Vergleich zum *C. glutamicum*-Medium. Zu hoch konzentrierte Lösungen können nicht präzise genug dosiert werden und rufen zu starke Schwankungen in der pH-Wert-Regelung hervor. Bei zu niedrig konzentrierten Lösungen wären wiederum die Fördermengen der Lösungen zu groß und die Kultur würde zu stark verdünnt werden. Schaumbildung wurde während einer *S. solfataricus*-Kultivierung nicht beobachtet, weshalb auf ein Antischaummittel verzichtet werden konnte. Bei einer Start-Begasungsrate von 1 L/min und einer Start-Rührergeschwindigkeit von 300 rpm fand bei *S. solfataricus* kein oder nur geringes Wachstum statt (**Abb. 15**). Die Begasungsrate wurde auf einen Anfangswert von 0.1 L/min und die Rührergeschwindigkeit auf 100 rpm herabgesetzt. Der pO<sub>2</sub>-Wert wurde wie bei der bereits

etablierten Methode bei 30 % konstant gehalten. Die Regelung des  $pO_2$ -Wertes wurde dabei über die Kaskade Begasungsrate→Rührergeschwindigkeit durchgeführt. Die jeweiligen Grenzwerte wurden entsprechend angepasst (siehe **Tab. 12**). Ein kompletter Verlauf einer *S. solfataricus*-Kultivierung mit den wichtigsten Parametern ist im Anhang in **Abb. 49** dargestellt.

Um evtl. höhere Zelldichten zu erreichen und um zu überprüfen, ob die Kohlenstoffmenge den limitierenden Faktor für das Wachstum darstellt, wurden zusätzlich verschiedene Glucosekonzentrationen im Minimalmedium getestet.



**Abb. 15** Wachstumskurven unterschiedlicher Kultivierungen im Bioreaktor bei 80 °C: die Kultivierung mit hohem O<sub>2</sub>-Eintrag und 0.4 % Glucose (schwarz), die Kultivierung mit niedrigem O<sub>2</sub>-Eintrag und 0.4 % Glucose (mittelgrau) und die Kultivierung mit niedrigem O<sub>2</sub>-Eintrag und 1.6 % Glucose (hellgrau).

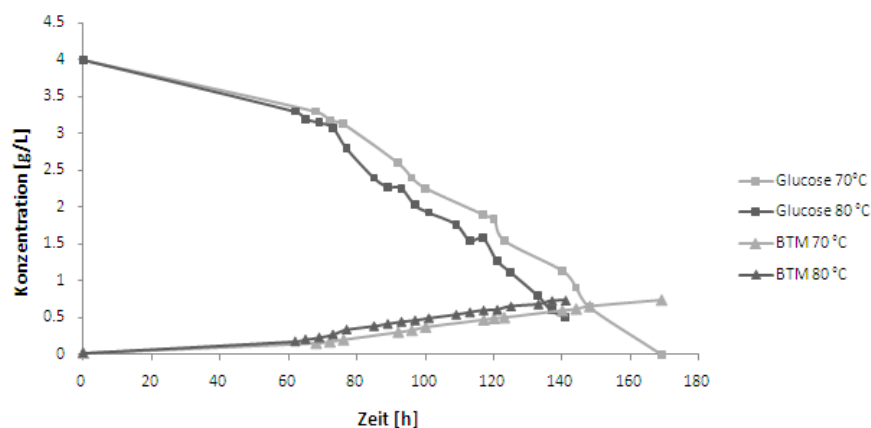
Wurde bei der Kultivierung von *S. solfataricus* mit einem hohen Sauerstoffeintrag entsprechend dem *C. glutamicum*-Protokoll gestartet, fand nur sehr geringes und langsames Wachstum statt (**Abb. 15**). Die optische Dichte lag nach 120 h bei nur 0.3. Bei einer Verringerung der anfänglichen Begasungsrate um ein Zehntel und der Rührergeschwindigkeit um ein Drittel, konnte eine Zunahme der OD, vergleichbar mit Kultivierungen in Schüttelkolben, beobachtet werden. Die OD erreichte hier nach 110 h einen Höchstwert von 1.4 im Vergleich zu Schüttelkolbenexperimenten, bei denen nach 110 h lediglich OD<sub>600</sub> 1 erreicht wurde.

Mit unterschiedlichen Glucosekonzentrationen im Medium wurde überprüft, ob die

C-Quelle der limitierende Faktor bei der Kultivierung ist. Wurde die Glucosekonzentration im Medium von den für das Medium vordefinierten 0.4 % auf 1.6 % erhöht, erreichten die Zellen nach 140 h einen Höchstwert von  $OD_{600}$  2.2. Dies zeigt deutlich, dass die Kohlenstoffquelle in der stationären Phase limitierend ist. Dabei veränderte sich die spezifische Wachstumsrate bei höheren Glucosekonzentrationen jedoch nicht.

### 3.1.6 Quantifizierung des assimilierten Kohlenstoffs

Die Korrelation zwischen Biotrockenmassezunahme und Glucoseverbrauch wurde für zwei Kultivierungstemperaturen bestimmt. Neben der Optimaltemperatur wurde für den Vergleich 70 °C gewählt. Dazu wurden während der Kultivierung im Bioreaktor, somit unter kontrollierten Bedingungen, der Zellzuwachs mittels Messungen der optischen Dichte und folglich die Berechnung der Biotrockenmassekonzentration sowie die Konzentration der Glucose im Zellüberstand zu bestimmten Zeitpunkten erfasst.

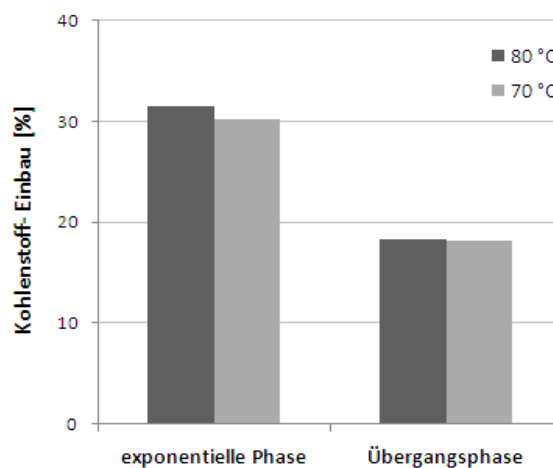


**Abb. 16** Konzentration von Biotrockenmasse (BTM) und Glucose im Medium bei 80 °C (dunkelgrau) und 70 °C (hellgrau), aufgetragen gegen die Zeit.

**Abb. 16** visualisiert sowohl den Anstieg der Biotrockenmasse über die Zeit als auch die Abnahme der Glucose im Medium bei 80 °C und 70 °C. Es ist zu erkennen, dass bei 80 °C die Glucoseabnahme schneller erfolgt als bei 70 °C, zudem steigt die Biotrockenmassekonzentration etwas schneller an. Bei beiden Temperaturen ist pro Gramm Biotrockenmasse etwa gleichviel Glucose verbraucht worden.

Mit den Formeln **2.8**, **2.9** und **2.10** wurden die Massenanteile des Kohlenstoffs in der Biotrockenmasse und in der Glucose berechnet und auf die Gesamtmenge der Kultur bezogen. Bei der Angabe für den C-Anteil in der Biotrockenmasse handelt es sich um einen empirischen Wert, der für alle Mikroorganismen annähernd gilt (Nielsen und Villadsen, 1994).

Im Anschluss wurde mit den Formeln **2.11** und **2.12** der C-Anteil aus der Glucose, der in die Biomasse eingebaut wurde, für die exponentielle Wachstumsphase und die Übergangsphase zwischen exponentieller und stationärer Phase berechnet. Die einzelnen Werte pro Zeitpunkt befinden sich im Anhang (**Tab. 20** und **21**).



**Abb. 17** Assimilierter Kohlenstoff in der exponentiellen und der Übergangsphase zwischen exponentieller und stationärer Phase bei 80 °C und 70 °C, angegeben in Prozent.

Der Anteil des Kohlenstoffs aus der Glucose, der für die Biomasseproduktion verwertet wurde, unterscheidet sich bei 70 °C und 80 °C nicht signifikant (**Abb. 17**). Bei beiden Temperaturen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase ca. 30 % assimiliert, während in der Übergangsphase zwischen exponentieller und stationärer Phase ungefähr 18 % Kohlenstoff eingebaut wurden. Der Rest wurde wahrscheinlich als CO<sub>2</sub> abgegeben oder zum Teil auch in Form C-haltiger Verbindungen ausgeschleust.

## 3.2 Methodenetablierung für die Metabolomanalyse

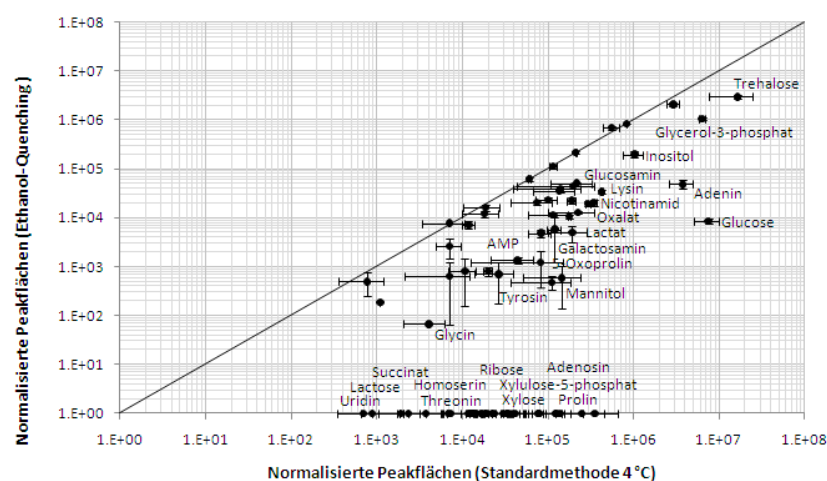
Die Aufarbeitungsmethode wurde zunächst nach dem Standardprotokoll für das Bakterium *C. glutamicum* (Strelkov et al., 2004) durchgeführt. Diese musste jedoch aufgrund der Andersartigkeit des neuen Organismus an einigen Stellen angepasst und optimiert werden.

### 3.2.1 Quenching

Die Metabolomanalyse soll eine „Momentaufnahme“ des biochemischen Zustands einer Zelle darstellen. Eine wichtige Voraussetzung für eine reproduzierbare und verlässliche Metabolomanalyse ist das vollständige Abstoppen aller enzymatischen Vorgänge in der Zelle zum Zeitpunkt der Zellernte, das sog. Quenching. Die Konzentrationen der Metabolite sollten sich während der weiteren Prozedur nicht mehr verändern.

#### Ethanol-Quenching bei unterschiedlichen Temperaturen

Eine für Bakterien und Hefe gut geeignete Methode ist das Quenching mit kaltem Ethanol (Spura et al., 2009). Diese Methode wurde auch für *S. solfataricus* getestet und die erzeugten Metabolomdaten mit der Standard-Aufarbeitungsmethode (**Kap. 2.8.1**) verglichen.



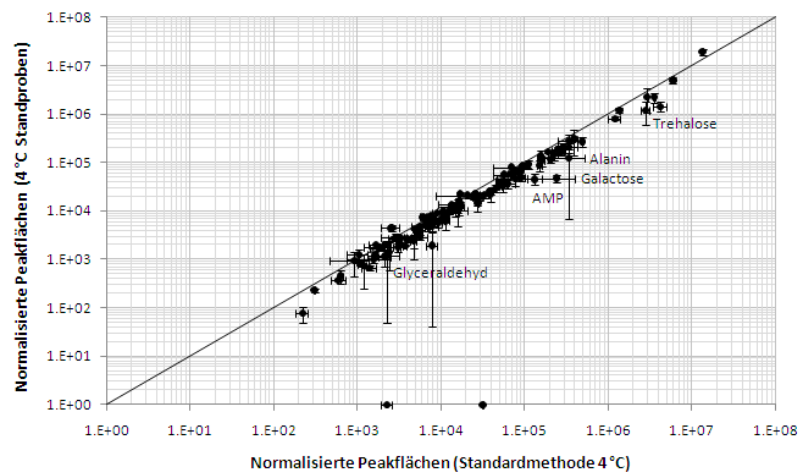
**Abb. 18** Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen von Proben, welche mit der Standardmethode bei 4 °C aufgearbeitet (x-Achse) und mit Ethanol (-20 °C) gequencht wurden (y-Achse).

Nahezu alle identifizierten Metabolite weisen in Proben, die mit Ethanol gequenchet wurden, verringerte Konzentrationen im Vergleich zu ungequenchten Proben auf (**Abb. 18**). Viele Stoffe wurden ausschließlich in den ungequenchten Proben identifiziert. Aufgrund der Annahme, dass undichte Zellen für Metabolitverluste verantwortlich sind (Wittmann et al., 2004), wurden die Überstände der gequenchten Zellen analysiert (Daten hier nicht gezeigt). Das Auffinden von Peaks, die sonst nur intrazellulär vorkommen, wie z.B. Aminosäuren und Intermediate des Kohlenhydratstoffwechsels, bestätigte die Hypothese von Metabolitverlusten aufgrund zu niedriger Temperaturen und/oder einer starken Empfindlichkeit gegenüber Ethanol.

Infolge dieses Ergebnisses wurde das Ethanol-Quenching zunächst nochmal bei 4 °C sowie bei Raumtemperatur (20 °C) durchgeführt und die Metabolomdaten mit der Standardmethode bei 4 °C verglichen. Die Ergebnisse (hier nicht gezeigt) waren jedoch fast identisch mit den Daten bei -20 °C. Fast alle Metabolite lagen in den gequenchten Proben in niedrigeren Konzentrationen vor bzw. konnten nicht detektiert werden.

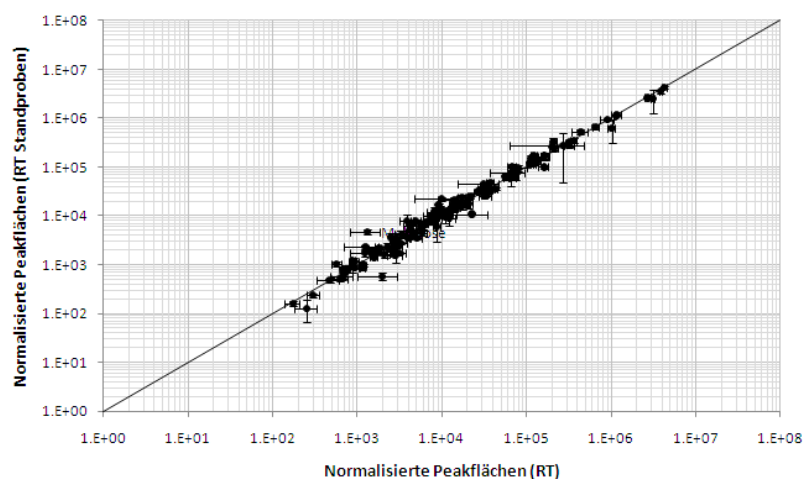
### **Standardmethode bei 4 °C und bei Raumtemperatur**

Aufgrund einer anzunehmenden Empfindlichkeit von *S. solfataricus* gegenüber sehr kalten Temperaturen wurde die Standardmethode bei Raumtemperatur (20 °C) anstatt bei 4 °C durchgeführt. Die geernteten Proben wurden im Eisbad auf die jeweilige Temperatur abgekühlt und anschließend erst pelletiert (siehe **Kap. 2.8.1**). Zur Kontrolle des Quench-Effekts wurde ein Teil der Proben für eine halbe Stunde bei der jeweiligen Temperatur inkubiert, während der andere Teil sofort aufgearbeitet wurde. Die Vergleiche für beide Temperaturen werden im Folgenden dargestellt.



**Abb. 19** Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen von Proben, welche mit der Standardmethode bei 4 °C aufgearbeitet wurden. Vergleich zwischen sofort aufgearbeiteten Proben (x-Achse) und Standproben (30 min bei 4 °C) (y-Achse).

Beim Vergleich der sofort aufgearbeiteten Proben bei 4 °C und der jeweiligen Standproben (**Abb. 19**) sind zum großen Teil Übereinstimmungen sowie auch einige Unterschiede in den Metabolitkonzentrationen zu erkennen. Trehalose, AMP, Glyceraldehyd, Alanin, Galactose und ein paar unbekannte Verbindungen (namentlich nicht gekennzeichnet) kommen nach der 30minütigen Inkubation in niedrigeren Konzentrationen vor oder wurden ausschließlich in den sofort aufgearbeiteten Proben identifiziert. Die nach Pearson berechnete Korrelation der beiden Zustände ergibt einen Wert von 0.952.



**Abb. 20** Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen von Proben, welche mit der Standardmethode bei RT (20 °C) aufgearbeitet wurden. Vergleich zwischen sofort aufgearbeiteten Proben (x-Achse) und Standproben (30 min bei RT) (y-Achse).

Der Vergleich zwischen sofort aufgearbeiteten Proben bei Raumtemperatur und den dazugehörigen Standproben zeigt fast keine signifikanten Veränderungen unter den identifizierten Metaboliten (**Abb. 20**). Dies bestätigt auch der Pearson Korrelationskoeffizient mit 0.991. Lediglich eine Verbindung weist in den Standproben eine niedrigere Konzentration auf. Dabei handelt es sich um eine unbekannte Verbindung. Der Standardfehler für diesen Metaboliten ist mit 48 % jedoch sehr groß.

### 3.2.2 Etablierung der Aufarbeitungsmethode

Infolge der Quenching-Ergebnisse wurde die Standard-Aufarbeitungsmethode, welche für den Organismus *C. glutamicum* etabliert worden war (Strelkov et al., 2004, siehe auch **Kap. 2.8.1**), an *S. solfataricus* angepasst, indem die Temperatur während der Waschschriffe von 4 °C auf 20 °C erhöht wurde. Zunächst musste jedoch das Entnahmenvolumen der Zellkultur für die Metabolomanalyse bestimmt werden.



### Bestimmung des Entnahmevolumens für die Metabolomanalyse

Um eine ausreichende Peakintensität, insbesondere von niedrigkonzentrierten Verbindungen, im Chromatogramm zu erreichen, war es bei der Aufarbeitung wichtig, genügend Zellmaterial einzusetzen. Als Grundlage diente, wie schon erwähnt, das Standardprotokoll für das Bakterium *C. glutamicum*. Hierbei wurden in der Mitte der exponentiellen Phase etwa 20 mg Biotrockenmasse geerntet. Folgende Formel beschreibt das Entnahmevolumen für *C. glutamicum*:

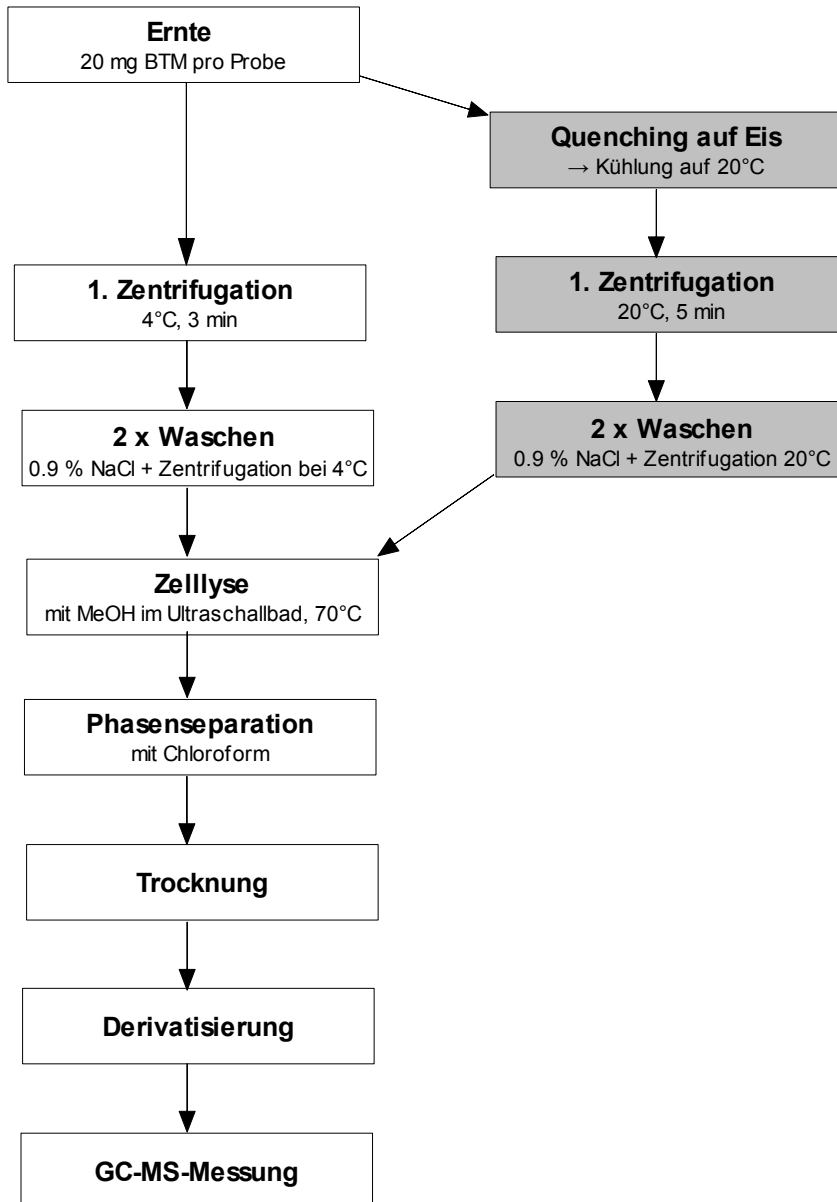
$$\text{Entnahmevolumen}_{C. glutamicum} (mL) = \frac{50}{OD_{600nm}} \quad (3.4)$$

Die entnommene Zellmasse konnte für *S. solfataricus* über den Quotienten der Biotrockenmassekoeffizienten beider Organismen angepasst werden.

$$\text{Entnahmevolumen}_{S. solfataricus} (mL) = \frac{40}{OD_{600nm}} \quad (3.5)$$

Mit dieser Formel konnte für jede Aufarbeitung ebenfalls eine konstante Zellmenge von 20 mg BTM entnommen werden. Diese erwies sich als geeignet für eine aussagekräftige Metabolomanalyse mit den hier angewandten Methoden. Da *S. solfataricus* in der Mitte der exponentiellen Phase noch keine ausreichend hohen Zelldichten aufwies, um das Volumen in einem 50 mL-Falcongefäß unterbringen zu können, wurde der Erntezeitpunkt auf das Ende der exponentiellen Wachstumsphase verschoben. Somit musste die optische Dichte mindestens bei 0.8 liegen.

Im Folgenden soll anhand eines Fließschemas die gesamte Aufarbeitungsprozedur mit den jeweiligen Veränderungen und Anpassungen an den neuen Organismus dargestellt werden:



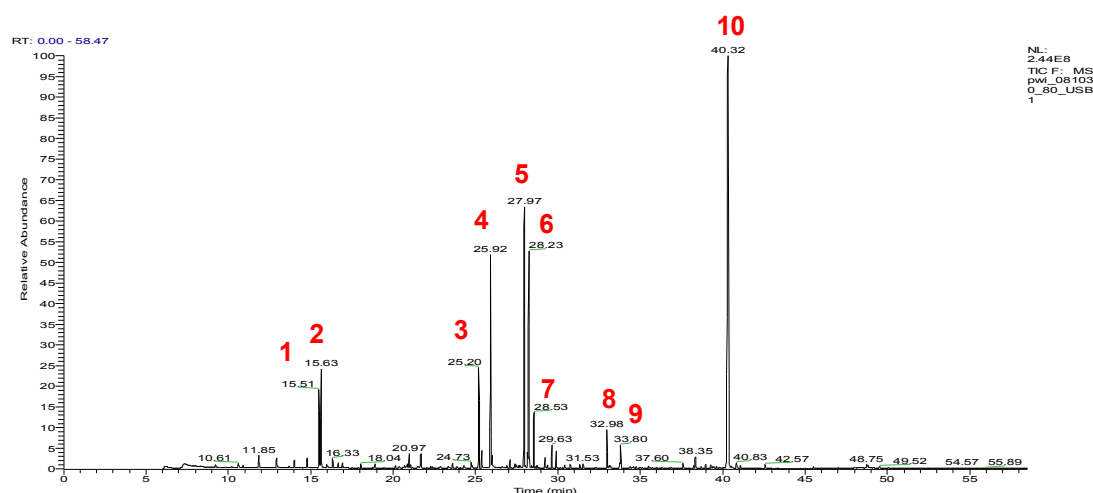
**Abb. 21** Anpassung der Standard-Aufarbeitungsmethode an *S. solfataricus*. Änderungen der einzelnen Schritte sind grau unterlegt.

Aus den Quenching-Versuchen ging hervor, dass bei Raumtemperatur besser reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden können als bei 4 °C oder niedrigeren Temperaturen. Quenching mit Ethanol scheint die Zellen porös zu machen. Außerdem ist das Verfahren

des Mischens der Kultur mit einer Quenchlösung für *S. solfataricus* aufgrund des großen Probenvolumens nicht geeignet. Aus diesem Grund wurde die heiße Kultur von außen im Eisbad auf RT (20 °C) heruntergekühlt. Der erste Zentrifugationsschritt wurde dementsprechend bei 20 °C anstatt 4 °C durchgeführt (**Abb. 21**). Aufgrund der höheren Temperatur wurde zur effektiveren Abtrennung des Mediums die Zentrifugationszeit von 3 min auf 5 min erhöht. Die Waschlösung (0.9 % NaCl) wurde vorher ebenfalls auf eine Temperatur von 20 °C anstatt 4 °C eingestellt, sowie auch die anschließenden Zentrifugationsschritte. Der weitere Verlauf der Probenaufarbeitung erwies sich als geeignet für *S. solfataricus* und konnte so übernommen werden.

### 3.3 Metabolomanalyse von *Sulfolobus solfataricus*

#### 3.3.1 Charakterisierung des metabolischen Profils von Stamm P2 1617



**Abb. 22** TIC (*total ion current*) eines Zellextrakts von *S. solfataricus* P2 1617, kultiviert bei optimalen Wachstumsbedingungen. Die roten Zahlen markieren die Peaks mit der höchsten Intensität: 1) Phosphat\_3TMS; 2) Glycerol\_3TMS; 3) Ribitol\_5TMS; 4) Glycerol-3-phosphat\_4TMS; 5), 6), 7) Glucosederivate; 8) Spermidin\_4TMS; 9) Unknown\_P2-113; 10) Trehalose\_8TMS

**Abb. 22** zeigt das typische Profil eines polaren Zellextrakts von *S. solfataricus*, gemessen

und ausgewertet mit den oben beschriebenen Methoden und der zur Verfügung stehenden Stoffbibliothek (**Kap. 2.8.3**). Nach einer 60minütigen GC-MS-Analyse wurden durchschnittlich 300 Peaks gefunden, welche ungefähr 80 identifizierte, reproduzierbare Metabolite (**Tab. 13**) beinhalten. Einige der identifizierten Metabolite kommen in zwei oder mehr Derivaten mit unterschiedlichen Konzentrationen vor und werden bei der Auswertung der Daten aufsummiert. Die meisten Verbindungen werden jedoch durch ein Derivat repräsentiert.

Der große Rest der 300 Peaks entspricht zahlreichen, meistens sehr kleinen, Störsignalen aus dem Grundrauschen, welche bei der Auswertung eliminiert wurden. Viele der detektierten Peaks mit einer ausreichend großen Intensität sind jedoch reproduzierbar, aber in der verwendeten Stoffbibliothek nicht vorhanden (*Unknowns*). Sie könnten eventuell neue, für den Organismus wichtige Metabolite darstellen.

Der Peak mit der höchsten Intensität ist Trehalose (10), gefolgt von Glucose, die in mehreren Derivaten mit hoher Intensität vorkommt (5, 6, 7). Weitere auffällige Peaks sind Glycerol-3-phosphat (4), der interne Standard Ribitol (3), Glycerol (2) und Phosphat (1). In etwas kleineren, aber dennoch hohen Intensitäten kommen Spermidin (8) und eine unbekannte Verbindung, genannt Unknown\_P2-113 (9), vor.

**Tab. 13** Übersicht über alle identifizierten Metabolite in Zellextrakten von *S. solfataricus* und die jeweiligen relativen Standardfehler.

Metabolite	Relativer Standardfehler [%]	Metabolite	Relativer Standardfehler [%]
<b>Aminosäuren</b>		Tyrosin	50.10
5-Oxoprolin	10.65	Valin	8.51
Alanin	5.64	<b>Organische Säuren</b>	
Aspartat	15.53	2-Hydroxyglutarat	5.20
beta-Alanin	11.31	2-Oxobutanoat	8.43
Glutamat	6.12	3-Hydroxybenzoat	34.48
Glycin	8.43	3-Methyl-2-oxobutanoat	19.82
Homoserin	20.19	4-Aminobutanoat	31.23
Isoleucin	27.26	4-Hydroxyphenylacetat	6.14
Lysin	8.84	Benzoat	6.23
O-Acetyl-serin	25.89	Citrat	9.33
Prolin	16.44	Fumarat	12.22
Serin	15.20	Galacturonat	6.25
Threonin	6.28	Gluconat	9.01

Metabolite	Relativer Standardfehler [%]	Metabolite	Relativer Standardfehler [%]
<b>Organische Säuren</b>		Rhamnose	8.35
Glucuronat	5.22	Ribose	46.61
Glyceraldehyd	51.22	Trehalose	7.25
Glycerat	5.50	Xylose	44.61
KDG	8.98	Xylulose	4.74
Lactat	10.46	<b>Alkohole</b>	
Malat	5.93	Erythritol	7.18
Malonat	16.18	Inositol	7.87
Oxalat	12.35	Mannitol	4.74
Oxomalonat	3.70	<b>Amine</b>	
Phenylpyruvat	23.61	1,3-Diaminopropan	4.80
Pyruvat	15.16	Galactosamin	9.21
Shikimat	10.99	Glucosamin	38.03
Succinat	14.85	Hydroxylamin	23.91
<b>Phosphorylierte Verbindungen</b>		N-Acetylglucosamin	24.93
AMP	18.53	Putrescin	10.27
Dihydroxyacetonphosphat	17.31	Spermidin	8.88
Fructose-6-phosphat	5.07	<b>Verschiedene Verbindungen</b>	
Glucosamin-6-phosphat	21.62	1,2,4-Trihydroxybenzen	7.79
Glucose-6-phosphat	5.48	5-Methylthioadenosin	9.07
Glycerol-3-phosphat	2.08	Adenin	9.80
Inositol-1-phosphat	6.41	Adenosin	8.67
Xylulose-5-phosphat	8.91	Glutamat_methylester	17.61
<b>Zucker</b>		Glycerol	3.81
Cellobiose	14.40	Homoserin-lacton	15.91
Fructose	13.04	Malat_4_methylester	7.04
Galactose	6.43	N-Hexanoyl-homoserin-lacton	11.68
Glucose	19.54	Nicotinamid	7.97
Lactose	8.79	Thymin	24.85
Maltotriose	13.25	Uracil	47.25
Mannose	16.64	Uridin	6.89
Palatinose	15.88		

Die Metabolite in **Tab. 13** wurden in insgesamt 12 Experimenten mit 55 biologischen Replikaten, darunter Kultivierungen bei 80 °C, 70 °C und 65 °C sowie Kultivierungen aller hier verwendeter *S. solfataricus*-Stämme (siehe **Kap. 2.3, Tab. 7**), identifiziert. Die dazugehörigen Peakflächen befinden sich im Anhang (**Tab 22**). Insgesamt 15 verschiedene Aminosäuren sowie Aminosäurederivate konnten reproduzierbar detektiert werden. Kleine organische Säuren, zum Teil auch aus dem Zentralstoffwechsel, bilden die größte Stoffklasse unter den identifizierten Metaboliten. Die Zucker hingegen stellen die

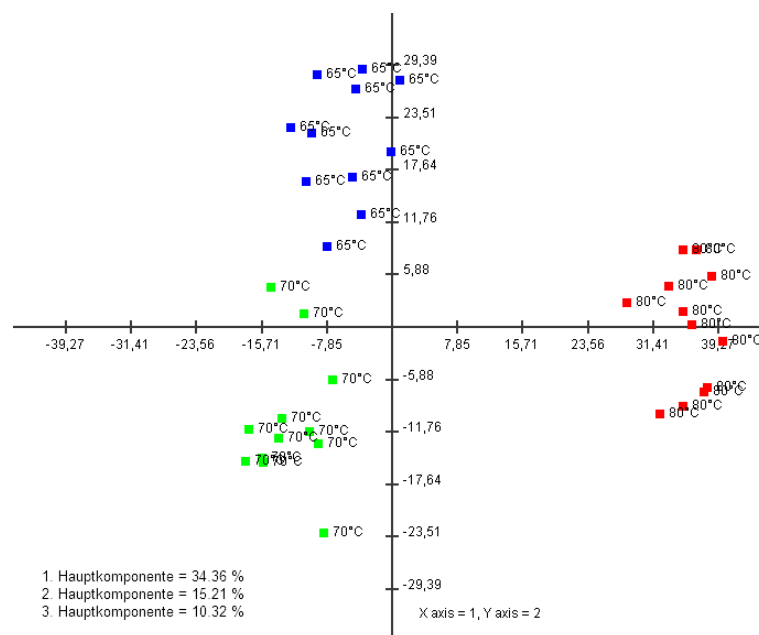
Verbindungen mit der höchsten Konzentration dar. In hohen Konzentrationen kommen auch einige Zuckeralkohole in *S. solfataricus*-Zellextrakten vor. Einige phosphorylierte Verbindungen geben Hinweise auf eine erfolgreiche Metabolitextraktion und Stabilität der Prozedur. Ebenfalls kommen mehrere Amine in auffallend hohen Konzentrationen im Organismus vor.

Der relative Standardfehler eines Metabolits stellt den Mittelwert von mindestens 3 biologischen Replikaten dar. Wie aus **Tab. 13** ersichtlich ist, variieren die Fehler der einzelnen Stoffe sehr stark. Das liegt zum großen Teil an der Konzentration der Verbindungen. Niedrig konzentrierte Metabolite, die nahe am Detektionslimit liegen, neigen zu größeren Schwankungen bei der Quantifizierung und somit zu größeren Standardfehlern. Auch die allgemeine Zugänglichkeit einer Verbindung für die angewandte Methode spielt eine Rolle. Einige Metabolite sind instabil und dissoziieren beispielsweise während der Derivatisierung schneller als andere.

Gemittelt ergeben die relativen Standardfehler aller Metabolite den relativen Gesamtfehler eines Versuchsansatzes. Dieser reflektiert die Reproduzierbarkeit der angewandten Methode von der Zellernte bis zur Analyse und Software-Auswertung. Der durchschnittliche relative Standardfehler zweier technischer Replikate beträgt 15 %, bei zwei biologischen Proben liegt er bei etwa 20 %, da in dem Fall noch die natürliche biologische Varianz hinzukommt.

### 3.3.2 Untersuchungen des Metaboloms bei Temperaturvariationen

Nachdem das Wachstumsverhalten von *S. solfataricus* bei unterschiedlichen Temperaturen charakterisiert worden ist, soll nun untersucht werden, was dabei auf Stoffwechselebene in der Zelle passiert. Im Rahmen des SulfoSys-Projekts sollten mögliche Anpassungsstrategien im zentralen Kohlenhydratstoffwechsel bei Temperaturen unter dem Optimum ergründet werden. Zusätzlich kann es von großem Interesse sein, Konzentrationsänderungen von Metaboliten aus peripheren Stoffwechselwegen genauer zu betrachten. Für die Analyse wurde das Wachstum bei 70 °C und 65 °C mit dem Optimum bei 80 °C verglichen. Die Zellen wurden zum Teil in größerem Maßstab im Bioreaktor kultiviert (**Kap. 2.6**) und an weitere SulfoSys-Teilnehmer zur Analyse des Transkriptoms, Proteoms und enzymatischer Reaktionen verschickt.



**Abb. 23** Darstellung der Proben des Temperaturversuchs in einer Hauptkomponentenanalyse (PCA). Die Punkte symbolisieren die einzelnen Replikate bei 80 °C (rot), 70 °C (grün) und 65 °C (blau). Die ersten 2 Komponenten der PCA beschreiben zusammen eine Gesamtvarianz von 49 %, während die ersten 3 Komponenten eine Gesamtvarianz von 60 % aufweisen.

In **Abb. 23** ist eine Trennung der Proben in drei Gruppen zu erkennen. Somit kann anhand der PCA eine grobe Einteilung in die unterschiedlichen Kultivierungstemperaturen vorgenommen werden. Die Proben bestehen bei jeder Temperatur aus 4 biologischen mit jeweils 3 technischen Replikaten. Auffällig ist, dass die 80 °C-Proben (rot) eine größere Distanz zu den anderen beiden Temperaturen aufweisen, während die 70 °C- und 65 °C-Proben nicht so stark voneinander getrennt sind. Eine genauere Analyse ergab, dass die Metabolite Xylulose, 1,3-Diaminopropan, Lactose, 4-Hydroxyphenylacetat und Glucosamin den stärksten Einfluss auf die Vektoren und damit auf die Trennung der einzelnen Zustände hatten.

### 3.3.2.1 70 °C im Vergleich zu 80 °C

Bei der Auswertung der Metabolomdaten von 80 °C- und 70 °C-Kulturen werden zunächst alle identifizierten Stoffe des zentralen Kohlenhydratstoffwechsels näher betrachtet

(Tab 14). Diese sollen später mit den *omics*-Daten der anderen SulfoSys-Partner verglichen werden. Daneben werden aber auch Metabolite aus peripheren Stoffwechselwegen untersucht, wenn sie signifikante Unterschiede zwischen 70 °C und 80 °C aufweisen.

Bei diesem Experiment wurden insgesamt 78 reproduzierbare Metabolite identifiziert. 37 davon weisen signifikante Veränderungen auf. Darunter befinden sich außerdem 11 *Unknowns*, die ebenfalls eine biologische *response* zeigen (siehe Tab 19 und 25).

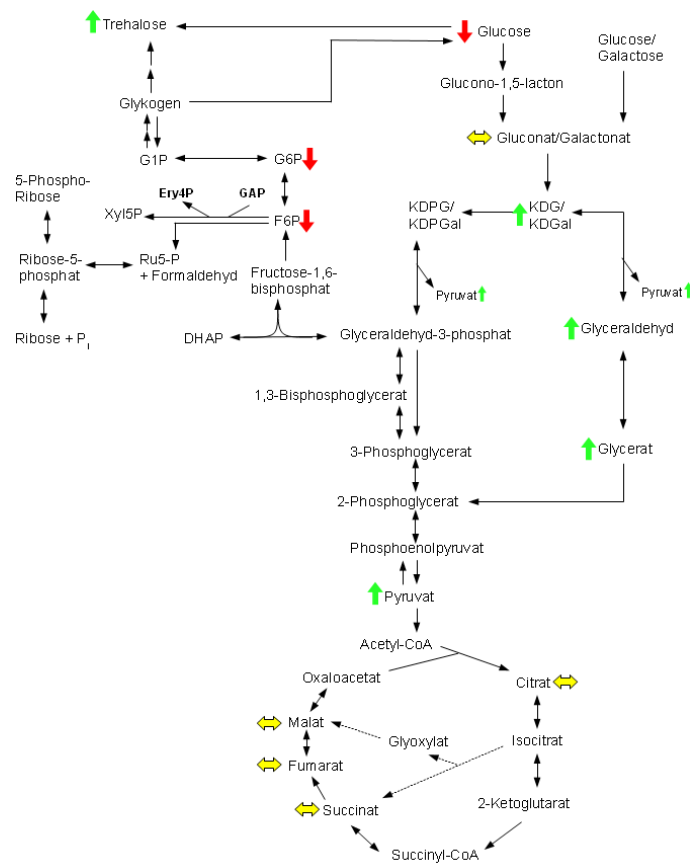
**Tab. 14** Vergleich der relativen Konzentrationen von identifizierten Metaboliten des zentralen Kohlenhydratstoffwechsels bei 70 °C und bei 80 °C.

Metabolit	Faktor 70 °C/80 °C	Relativer Standardfehler 80 °C [%]	Relativer Standardfehler 70 °C [%]
Pyruvat	nur bei 70 °C identifiziert		± 23.17
KDG	4.90	± 11.38	± 2.59
Glyceraldehyd	3.22	± 42.13	± 27.04
Glycerat	2.55	± 6.56	± 8.54
Trehalose	1.70	± 5.65	± 4.62
Gluconat	1.43	± 12.8	± 11.69
Citrat	0.96	± 15.24	± 4.06
Fumarat	0.98	± 30.57	± 8.38
Malat	1.01	± 3.47	± 3.23
Succinat	1.02	± 14.45	± 11.06
Fructose-6-phosphat	0.44	± 8.42	± 22.18
Glucose-6-phosphat	0.43	± 3.81	± 5.96
Glucose	0.36	± 28.74	± 6.63

**Tab. 14** gibt die Verhältnisse der gemittelten Peakflächen von Metaboliten des zentralen Kohlenhydratstoffwechsels bei 70 °C und 80 °C und die jeweiligen relativen Standardfehler wieder. Die grünen Zahlen stellen signifikant hoch-, die roten Zahlen signifikant herunterregulierte Metabolite bei 70 °C dar. Die Signifikanz wurde mittels eines t-Tests mit einem Signifikanzniveau von 0.05 bestimmt. Metabolite mit nichtfarbigen Zahlen weisen keine signifikanten Unterschiede auf. Pyruvat wurde lediglich bei 70 °C identifiziert. Im



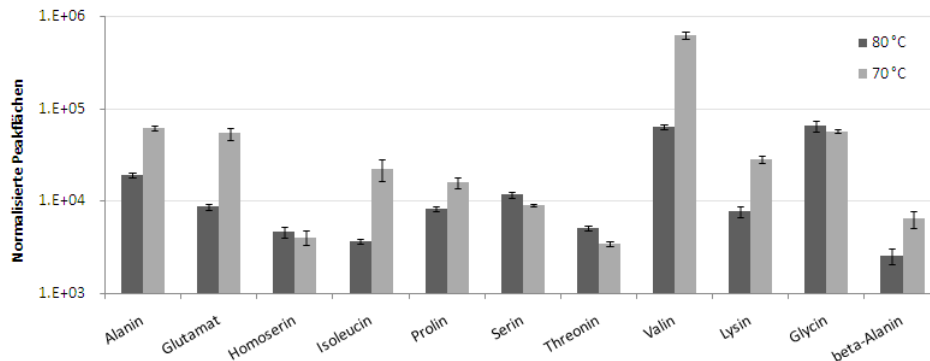
Folgenden werden die Veränderungen der Metabolite des zentralen Kohlenhydratstoffwechsels anhand einer Stoffwechselkarte dargestellt.



**Abb. 24** Schematische Darstellung des verzweigten Entner-Doudoroff-Weges (ED), des Zitronensäurezyklus, der Gluconeogenese und des Pentosephosphatweges bei *S. solfataricus*. Dargestellt wird der Vergleich zwischen 70 °C und 80 °C. Identifizierte Metabolite werden durch farbige Pfeile symbolisiert. Sie sind bei 70 °C signifikant erhöht (grün), signifikant erniedrigt (rot) oder weisen keinen signifikanten Unterschied auf (gelb). Metabolite ohne Pfeil wurden nicht detektiert.

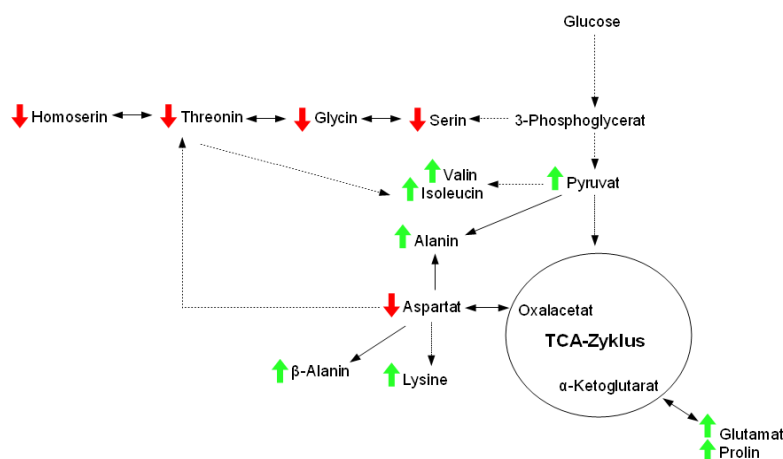
In **Abb. 24** ist zu erkennen, dass Metabolite des nicht-phosphorylierenden ED-Weges bei 70 °C hochreguliert sind. Das Verhältnis zwischen 70 °C und 80 °C ist dabei für KDG mit 4.9 am größten, gefolgt von Glycerinaldehyd mit 3.22 und Glycerat mit 2.55 (**Tab. 14**). Weiterhin ist Trehalose bei 70 °C um Faktor 1.7 leicht erhöht. Pyruvat wurde ausschließlich bei 70 °C identifiziert. Dagegen ist die Konzentration von Glucose-6-phosphat und Fructose-6-phosphat, welche bei der Gluconeogenese eine Rolle spielen, bei 70 °C um

etwa die Hälfte erniedrigt. Ebenso ist Glucose bei 70 °C herunterreguliert. Metabolite des Zitronensäurezyklus zeigen keine signifikanten Unterschiede.



**Abb. 25** Logarithmische Darstellung der mittleren relativen Konzentrationen von identifizierten Aminosäuren bei 70 °C und 80 °C.

Wie in **Abb. 25** zu erkennen ist, sind viele Aminosäuren bei 70 °C erhöht im Gegensatz zu 80 °C, vor allem Alanin, Glutamat, Isoleucin, Valin, Lysin und beta-Alanin sind um Faktor 2.5 bis 10 höher konzentriert. Dagegen liegen die Aminosäuren Homoserin, Serin, Threonin und Glycin bei 70 °C in signifikant niedrigeren Konzentrationen vor, allerdings sind die Unterschiede nicht so groß wie bei den hochregulierten Aminosäuren.



**Abb. 26** Übersicht über die Hauptbiosynthesewege von identifizierten Aminosäuren. Durchgängige Linien stellen direkte Reaktionen zwischen zwei Metaboliten dar, während gestrichelte Linien Zwischenreaktionen beinhalten. Grüne Pfeile symbolisieren signifikant hochregulierte, rote Pfeile signifikant herunterregulierte Stoffe.

In **Abb. 26** wird deutlich, dass Aminosäuren, die ihren Biosyntheseweg mit 3-Phosphoglycerat beginnen, bei 70 °C herunterreguliert sind, während Aminosäuren, die direkt oder indirekt aus Pyruvat und  $\alpha$ -Ketoglutarat gebildet werden, hochreguliert sind. Aspartat wird über Oxalacetat gebildet und ist bei der niedrigeren Temperatur herunterreguliert, wobei die Aminosäuren, die über die Vorstufe Aspartat synthetisiert werden, hochreguliert sind.

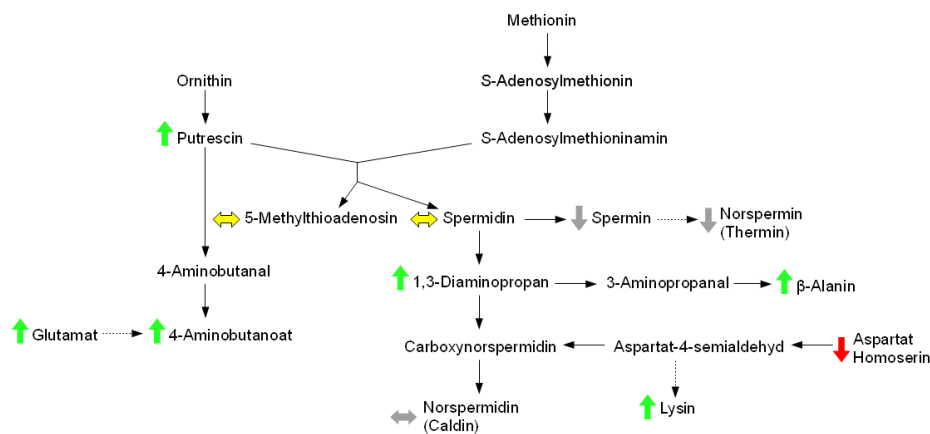
**Tab. 15** Vergleich der relativen Konzentrationen von identifizierten Metaboliten aus unterschiedlichen Stoffwechselwegen bei 70 °C und bei 80 °C.

Metabolite	Faktor 70 °C/80 °C	Relativer Standardfehler 80 °C [%]	Relativer Standardfehler 70 °C [%]
1,3-Diaminopropan	nur bei 70 °C identifiziert		± 5.29
1,2,4-Trihydroxybenzen	nur bei 70 °C identifiziert		± 22.85
4-Aminobutanoat	nur bei 70 °C identifiziert		± 7.84
Erythritol	7.96	± 11.48	± 1.67
Lactose	6.01	± 11.08	± 2.95
Fructose	4.62	± 27.58	± 2.75
Inositol	3.82	± 7.25	± 1.71
Glucosamin	3.25	± 3.77	± 14.82
Galactosamin	2.95	± 9.60	± 10.78
2-Hydroxyglutarat	2.88	± 7.09	± 3.78
Xylulose	2.71	± 7.76	± 2.43
Hydroxylamin	1.78	± 5.59	± 3.90
Putrescin	1.77	± 13.49	± 6.37
Galacturonat	1.61	± 6.57	± 10.40
Lactat	1.59	± 14.31	± 3.94
Mannitol	1.50	± 5.69	± 1.75
Homoserin-lacton	1.44	± 36.0	± 21.83
Glycerol	1.07	± 8.74	± 7.46
Shikimat	1.05	± 10.45	± 10.89
Galactose	0.96	± 6.53	± 6.87
Spermidin	0.90	± 6.83	± 19.31
Adenin	0.85	± 9.57	± 3.89

## Ergebnisse

Metabolite	Faktor 70 °C/80 °C	Relativer Standardfehler 80 °C [%]	Relativer Standardfehler 70 °C [%]
5'-Methylthioadenosin	0.81	± 8.54	± 4.43
Uracil	0.74	± 13.20	± 22.31
Adenosin	0.66	± 9.98	± 10.95
Inositol-1-phosphat	0.42	± 8.2	± 24.4
Glycerol-3-phosphat	0.41	± 2.44	± 2.41
AMP	0.09	± 35.68	± 57.04
Aspartat	nur bei 80 °C identifiziert	± 7.78	
4-Hydroxyphenylacetat	nur bei 80 °C identifiziert	± 5.06	

In **Tab. 15** werden die Verhältnisse der gemittelten Peakflächen von Metaboliten aus unterschiedlichen Stoffwechselwegen bei 70 °C und 80 °C und die jeweiligen relativen Standardfehler zusammengefasst. Die grünen Zahlen stellen signifikant hoch-, die roten Zahlen signifikant herunterregulierte Metabolite bei 70 °C dar. Die Signifikanz wurde mittels eines t-Tests mit einem Signifikanzniveau von 0.05 bestimmt. Metabolite mit nichtfarbigen Zahlen weisen keine signifikanten Unterschiede auf. 16 Metabolite sind bei 70 °C signifikant hochreguliert bzw. nur bei 70 °C detektiert worden, während nur 6 Metabolite signifikant herunterreguliert bzw. nur bei 80 °C detektiert worden sind. Zu den hochregulierten gehören mehrere Zuckeralkohole, Monosaccharide und aminhaltige Verbindungen. 1,3 Diaminopropan wurde ausschließlich bei 70 °C detektiert. Herunterreguliert sind dagegen einige phosphorylierte Verbindungen. 4-Hydroxyphenylacetat wurde ausschließlich bei 80 °C detektiert.



**Abb. 27** Schematische Darstellung eines Teils des Polyaminstoffwechsels. Identifizierte Metabolite werden durch farbige Pfeile symbolisiert. Sie sind bei 70 °C signifikant erhöht (grün), signifikant erniedrigt (rot) oder weisen keinen signifikanten Unterschied auf (gelb). Metabolite ohne Pfeil wurden nicht detektiert. Graue Pfeile deuten auf Metabolite hin, die bisher nicht in der verwendeten Stoffbibliothek vorhanden sind, dessen Präsenz aber aufgrund des Massenspektrums einiger unbekannter Peaks vermutet wird (siehe **Kap. 3.3.6**).

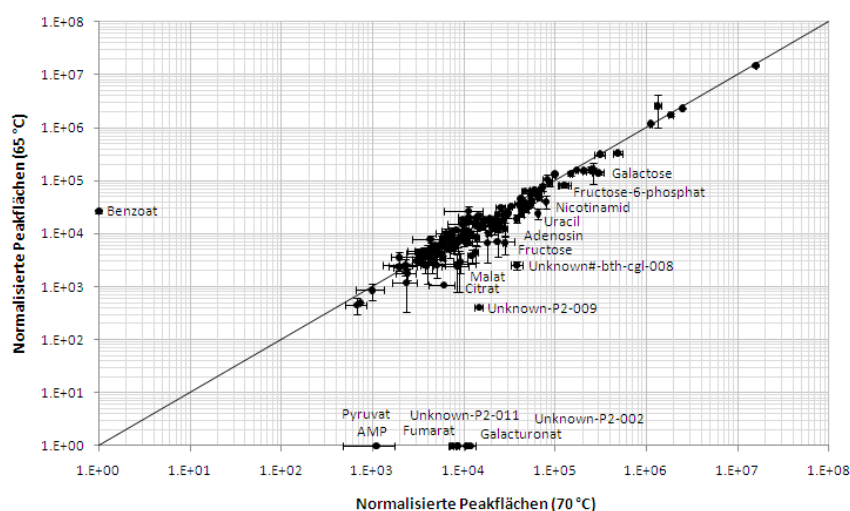
In **Abb. 27** sind identifizierte Metabolite aus einem Ausschnitt des Polyaminstoffwechsels dargestellt. Während Putrescin bei 70 °C hochreguliert ist, sind die beiden Verbindungen 5-Methylthioadenosin und Spermidin, die unter anderem aus Putrescin gebildet werden, nicht signifikant verändert. 1,3-Diaminopropan ist nur bei 70 °C detektierbar. In Relation dazu steht die erhöhte Konzentration von β-Alanin und die unveränderte Konzentration einer Verbindung, deren Massenspektrum und RI eine hohe Ähnlichkeit zum Caldin-Standard aufweist. Dagegen sind Polyamine, die aus Spermidin synthetisiert werden, möglicherweise herunterreguliert.

### 3.3.2.2 65 °C im Vergleich zu 70 °C

Eine Herabsetzung der Kultivierungstemperatur um weitere 5 °C könnte eventuelle Adaptationen des Stoffwechsels im Vergleich zu 70 °C verstärken oder auch andere Strategien in der Anpassung bewirken. Um dies zu zeigen, wird im Folgenden der Vergleich zwischen 65 °C und 70 °C anhand eines Streudiagramms dargestellt.

Metabolite, die um Faktor > 2 bzw. < 0.5 von der Mittelachse abweichen, werden

namentlich gekennzeichnet und stellen entsprechend einen hoch- bzw. herunterregulierten Metaboliten dar. Unbekannte Substanzen, deren Massenspektren noch nicht in der verwendeten Stoffbibliothek hinterlegt sind, werden in den Streudiagrammen als „Unknown“ bezeichnet. Sie werden in **Kap. 3.3.6** näher erläutert. Aufgrund der Übersichtlichkeit können nicht alle signifikant veränderten *Unknowns* namentlich gekennzeichnet werden. Lediglich gut reproduzierbare Verbindungen mit interessanter biologischer *response* werden berücksichtigt. Metabolite, die entweder auf der x-Achse bzw. y-Achse auftreten, kommen entweder im jeweils anderen Zustand nicht vor oder, wie in den meisten Fällen, liegen unter dem Detektionslimit.



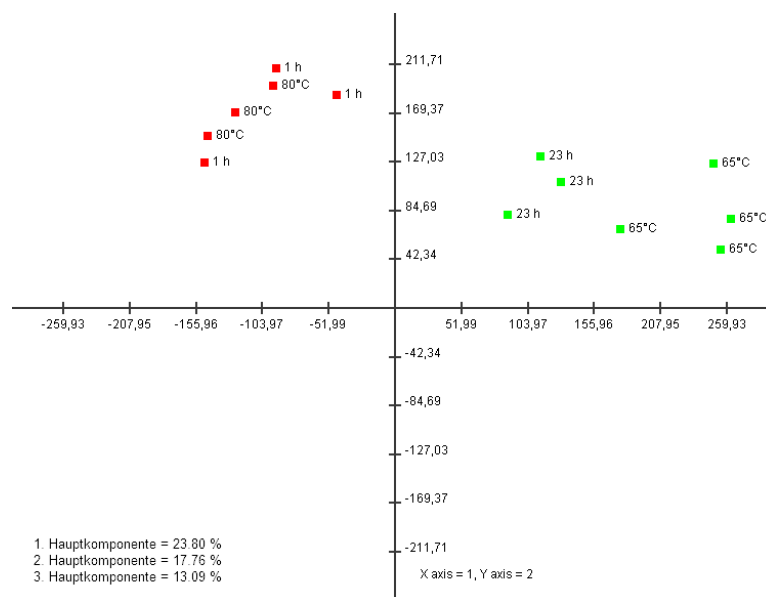
**Abb. 28** Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen. Vergleich zwischen Proben, die bei 70 °C und 65 °C kultiviert wurden.

Der Vergleich zwischen 70 °C und 65 °C zeigt einige Unterschiede unter den detektierten Metabolitkonzentrationen (**Abb. 28**). Bei allen signifikanten Veränderungen handelt es sich um erniedrigte Konzentrationen bei 65 °C. Lediglich Benzoat wurde ausschließlich bei 65 °C detektiert. Metabolite des Zitronensäurezyklus, wie Citrat, Fumarat und Malat sind bei 65 °C erniedrigt. Weiterhin kommen auch die Nukleotidbasen Adenosin und Uracil sowie Nicotinamid und AMP in niedrigeren Konzentrationen bei 65 °C vor. Die Kohlenhydrate Galactose und Fructose, sowie Fructose-6-phosphat aus der Gluconeogenese sind ebenfalls herunterreguliert. Pyruvat konnte lediglich in den 70 °C-Proben detektiert werden. Unknown-P2-009 ist bei 65 °C stark herunterreguliert. Galacturonat

sowie Unknown-P2-011 konnten lediglich bei 65 °C detektiert werden. Insgesamt bestehen keine großen Unterschiede zwischen 65 °C und 70 °C, was mit einem Korrelationskoeffizienten nach Pearson von 0.995 bekräftigt wird.

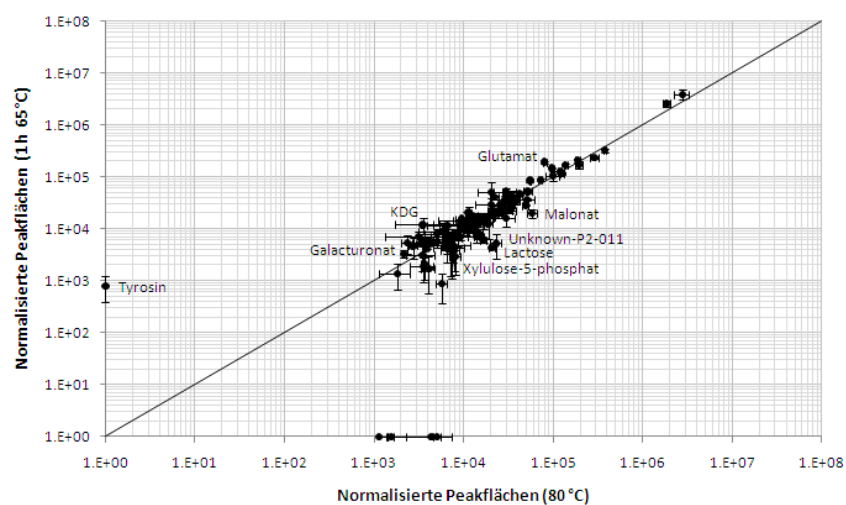
### 3.3.3 Kälteschock von 80 °C auf 65 °C

Neben der kontinuierlichen Kultivierung bei Temperaturen unterhalb des Optimums wurden die Zellen einem plötzlichen Kälteschock von 80 °C auf 65 °C ausgesetzt (**Kap. 2.7.1**). Auf diese Weise können eventuelle schnelle Änderungen und Anpassungen im Stoffwechsel untersucht werden. Verglichen werden dabei die metabolischen Profile von Zellen vor dem Kälteschock bei 80 °C und eine Stunde und 23 Stunden nach dem Kälteschock bei einer fortgesetzten Kultivierungstemperatur von 65 °C. Zusätzlich werden die 23 h-Proben mit einer Kultur verglichen, die kontinuierlich bei 65 °C kultiviert wurde, um das Ausmaß einer möglichen Anpassung beurteilen zu können.



**Abb. 29** Darstellung der Proben des Kälteschock-Experiments in einer Hauptkomponentenanalyse (PCA). Die roten Punkte symbolisieren die Proben bei 80 °C (80 °C) und eine Stunde nach dem Kälteschock bei 65 °C (1 h), die grünen Punkte stellen die Proben nach 23 Stunden bei 65 °C (23 h) und die Proben der kontinuierlichen 65 °C-Kultur (65 °C) dar. Die 1. und 2. Komponente der PCA beschreiben zusammen eine Gesamtvarianz von 41.5 %, die ersten 3 Komponenten machen 54.6 % aus.

**Abb. 29** zeigt eine deutliche Trennung der Proben in zwei Gruppen. Einerseits besteht eine Gruppierung aus den Proben vor dem Kälteschock sowie den Proben eine Stunde nach dem Temperaturabfall auf 65 °C. Andererseits clustern die Proben, welche 23 Stunden nach dem Kälteschock geerntet wurden, mit Proben aus einer kontinuierlichen 65 °C-Kultur. Genauere Analysen zeigten, dass die Metabolite Tyrosin, 5'-Methylthioadenosin und einige unbekannte Verbindungen den größten Einfluss auf die Vektoren und damit auf die Trennung der einzelnen Proben hatten. Im Folgenden sollen anhand von Streudiagrammen die Differenzen zwischen den einzelnen Zuständen visualisiert werden.

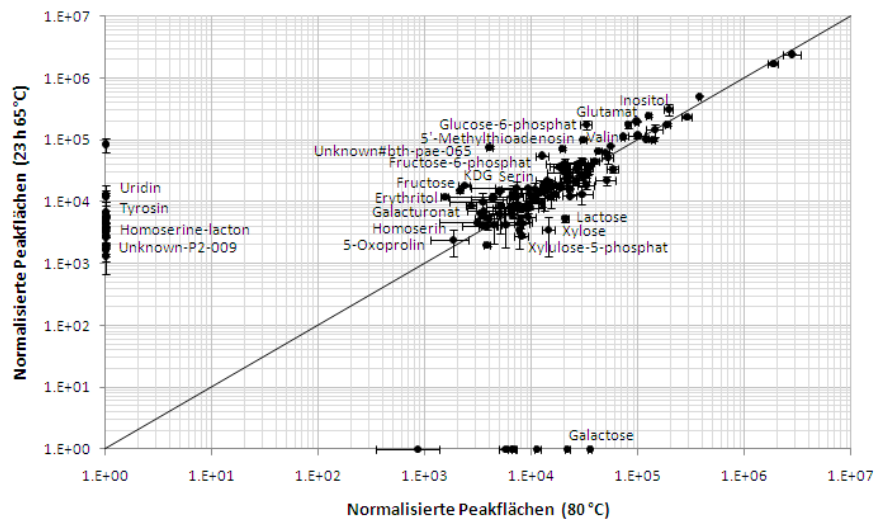


**Abb. 30** Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen. Vergleich zwischen 80 °C-Proben und Proben aus derselben Kultur, die einem abrupten Kälteschock von 80 °C auf 65 °C ausgesetzt und eine Stunde bei 65 °C weiter kultiviert wurden.

In **Abb. 30** sind keine großen Veränderungen im Stoffwechsel zwischen der Referenzkultur bei 80 °C und Proben, die eine Stunde nach dem Kälteschock geerntet wurden, zu verzeichnen. Die Aminosäure Tyrosin konnte ausschließlich in den Proben nach dem Kälteschock detektiert werden. Glutamat und Galacturonat sind leicht hochreguliert. Im zentralen Kohlenhydratstoffwechsel weisen KDG und Glucose-6-phosphat leicht erhöhte Konzentrationen auf, während Xylulose-5-phosphat in den Kälteschock-Proben herunterreguliert ist. Malonat, Lactose sowie Unknown-P2-011 kommen ebenfalls in erniedrigten

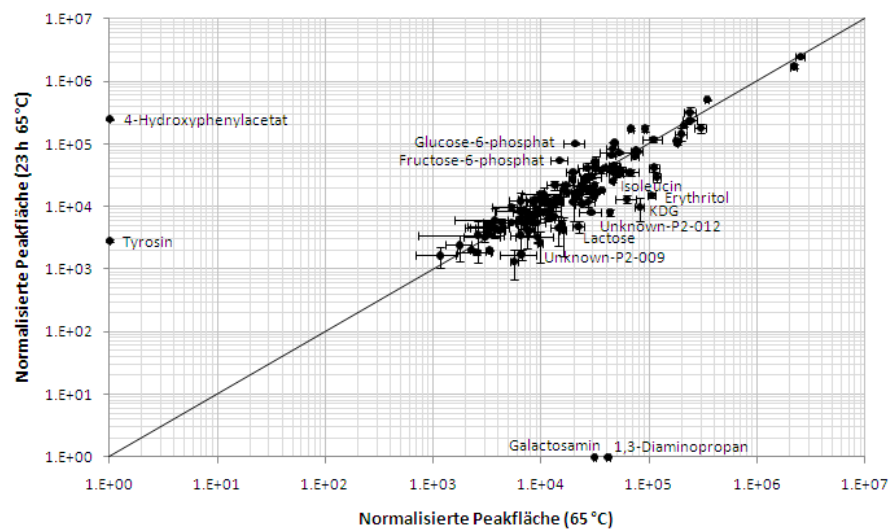


Konzentrationen nach dem Kälteschock vor.



**Abb. 31** Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen. Vergleich zwischen 80 °C-Proben und Proben aus derselben Kultur, die einem abrupten Kälteschock von 80 °C auf 65 °C ausgesetzt und 23 Stunden lang bei 65 °C weiter kultiviert wurden.

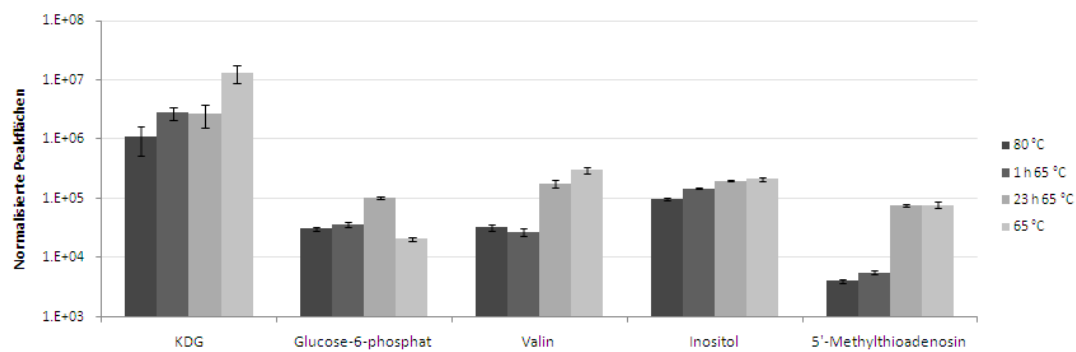
23 Stunden nach dem Kälteschock bei einer fortgesetzten Kultivierungstemperatur von 65 °C sind deutlich mehr Veränderungen im Stoffwechsel zu sehen (**Abb. 31**). Die meisten der identifizierten Metabolite liegen in höheren Konzentrationen vor. Intermediate des zentralen Kohlenhydratstoffwechsels wie KDG, Glucose-6-phosphat und Fructose-6-phosphat sind 23 Stunden nach dem Kälteschock hochreguliert. Das Gleiche gilt für einige Aminosäuren und Zuckeralkohole. Homoserin-lacton wurde ausschließlich nach dem Kälteschock detektiert. Einige Disaccharide, wie Lactose, Xylose und Galactose sind dagegen herunterreguliert. Auch Xylulose-5-phosphat kommt in niedrigeren Konzentrationen vor.



**Abb. 32** Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen. Vergleich zwischen kontinuierlichen 65 °C-Proben und Proben, die nach einem Kälteschock für 23 Stunden bei 65 °C weiter kultiviert wurden.

Beim Vergleich von Proben, die 23 Stunden nach dem Kälteschock bei 65 °C weiterkultiviert wurden, mit einer kontinuierlichen 65 °C-Kultur, sind einige Unterschiede in den Metabolitkonzentrationen zu erkennen (**Abb. 32**). Glucose-6-phosphat und Fructose-6-phosphat aus dem Zentralstoffwechsel, sowie 4-Hydroxyphenylacetat und Tyrosin sind in den Kälteschock-Proben hochreguliert. Dagegen liegen in der kontinuierlichen 65 °C-Kultur KDG, Erythritol, Lactose, Galactosamin, Isoleucin, 1,3 Diaminopropan sowie Unknown-P2-009 und Unknown-P2-012 in höheren Konzentrationen vor.

Nachfolgend werden einige ausgewählte Metabolitkonzentrationen und ihre Veränderungen in den 4 Zuständen anhand eines Balkendiagramms veranschaulicht.

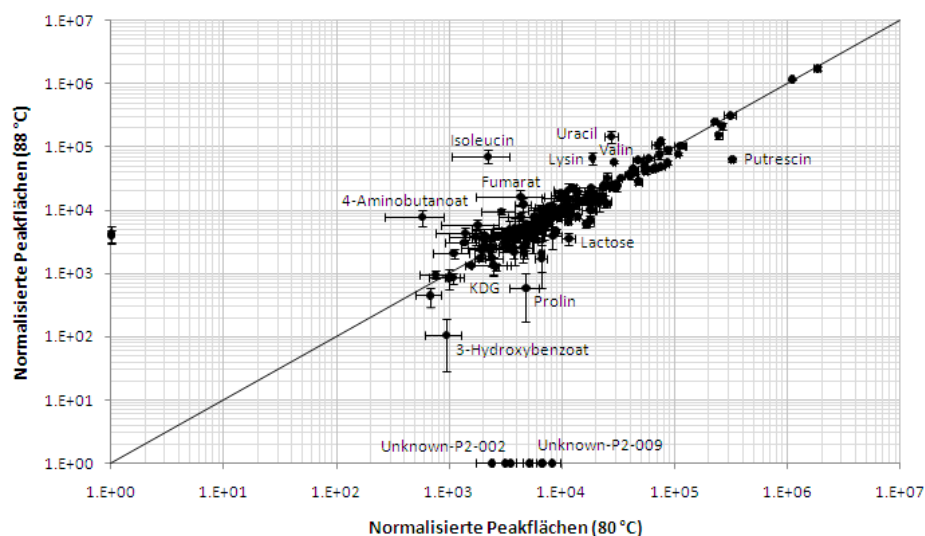


**Abb. 33** Logarithmische Darstellung der mittleren relativen Konzentration von 5 Metaboliten aus dem Kälteschock-Experiment. Die dunklen Balken stellen die Metabolitkonzentrationen aus der Kultur bei 80 °C kurz vor dem Kälteschock dar. Es folgen 1 h und 23 h nach dem Kälteschock. Die hellgrauen Balken repräsentieren die relativen Metabolitkonzentrationen einer kontinuierlichen 65 °C-Kultur.

Die Konzentration von KDG nimmt nach dem Kälteschock schnell zu und bleibt dann konstant (**Abb. 33**). In einer kontinuierlichen 65 °C-Kultur ist KDG signifikant höher als 23 h nach dem Kälteschock. Glucose-6-phosphat wird ebenfalls hochreguliert, die Konzentration in der kontinuierlichen Kultur ist jedoch niedriger als nach dem Kälteschock und der 80 °C-Kultur. Bei Valin und 5'-Methylthioadenosin ändert sich innerhalb der ersten Stunde nach dem Kälteschock nichts, während die Metabolite sich nach 23 h an die Konzentrationen in der kontinuierlichen 65 °C-Kultur anpassen. Inositol steigt kontinuierlich und passt seine Konzentration der 65 °C-Kultur ebenfalls nach 23 h an.

### 3.3.4 Hitzeschock von 80 °C auf 88 °C

Um mögliche Anpassungen des Stoffwechsels von *S. solfataricus* bei Temperaturen über dem Optimum zu ergründen, wurden die Zellen einem Hitzeschock von 80 °C auf 88 °C ausgesetzt (**Kap. 2.7.2**). Anschließend wurden sie für eine Stunde bei 88 °C weiterkultiviert. Proben für die Metabolomanalyse wurden kurz vor dem Hitzeschock (80 °C) und eine Stunde nach dem Hitzeschock (88 °C) entnommen.



**Abb. 34** Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen. Vergleich zwischen 80 °C-Proben und Proben aus derselben Kultur, die nach einem Hitzeschock für 1 Stunde bei 88 °C weiter kultiviert wurden.

Nach einem einstündigen Hitzeschock bei 88 °C lassen sich einige veränderte Metabolitkonzentrationen feststellen (**Abb. 34**). Mehrere Aminosäuren, wie Isoleucin, Lysin und Valin sind signifikant hochreguliert, ebenso die organischen Säuren Fumarat und 4-Aminobutanoat. Stark herunterreguliert ist Putrescin. Mit einem Faktor von 5 und dem kleinsten Fehler ist diese Veränderung sehr deutlich. Erniedrigte Konzentrationen weisen Lactose, KDG, Prolin und 3-Hydroxybenzoat auf. Zwei *Unknowns* - Unknown-P2-002 und Unknown-P2-009 - wurden ausschließlich bei 80 °C vor dem Hitzeschock detektiert.

**Tab. 16** Hoch- bzw. herunterregulierte Metabolite nach einem Hitzeschock bei 88 °C im Vergleich zu 80 °C.

Metabolite	Faktor 88 °C/80 °C	Relativer Standardfehler 80 °C [%]	Relativer Standardfehler 88 °C [%]
Fumarat	2.76	± 16.90	± 22.99
AMP	1.79	± 5.91	± 10.57
Malat	1.6	± 10.62	± 13.0
Succinat	1.2	± 6.58	± 16.31
Trehalose	0.78	± 4.64	± 2.06

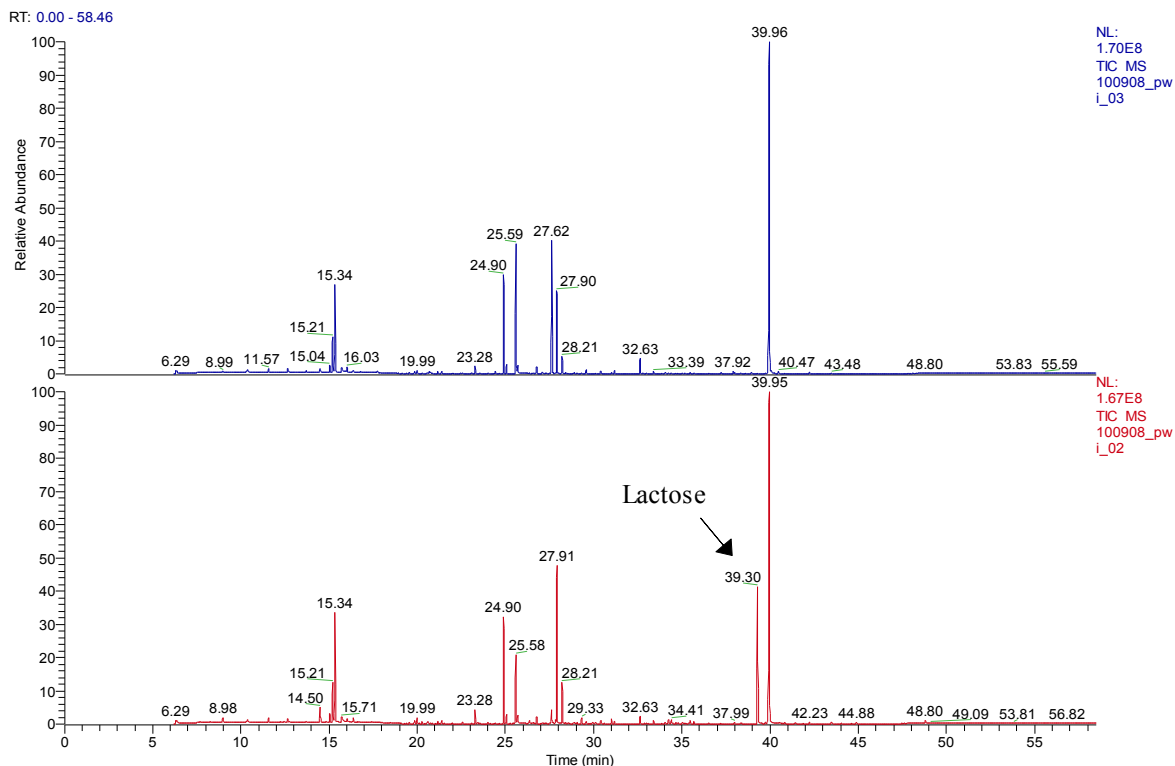
Metabolite	Faktor 88 °C/80 °C	Relativer Standardfehler 80 °C [%]	Relativer Standardfehler 88 °C [%]
Fructose-6-phosphat	0.72	± 2.71	± 10.65
Inositol	0.7	± 5.66	± 6.18
Glucose-6-phosphat	0.67	± 4.70	± 9.49
Xylulose	0.66	± 2.28	± 6.68
Spermidin	0.63	± 6.75	± 11.56
Erythritol	0.6	± 4.52	± 8.03

In **Tab. 16** werden leicht veränderte Metabolitkonzentrationen zwischen 88 °C und 80 °C aufgeführt. Die Verhältnisse der Peakflächen sind für eine Darstellung im Streudiagramm zu klein, da sie nicht größer als 2 bzw. nicht kleiner als 0.5 sind (ausgenommen Fumarat). Anhand eines t-Tests wurde ihre Abweichung, bis auf Succinat, dennoch als signifikant eingestuft. Auffällig ist, dass Intermediate des Zitronensäurezyklus nach dem Hitzeschock erhöht sind. Succinat ist nicht signifikant erhöht, zeigt jedoch eine Tendenz in diese Richtung. AMP kommt ebenfalls in erhöhten Konzentrationen vor. Trehalose, Glucose-6-phosphat und Fructose-6-phosphat zeigen erniedrigte Konzentrationen nach dem Hitzeschock. Das Gleiche gilt für Inositol, Xylulose, Spermidin und Erythritol.

### 3.3.5 Stamm PBL 2025 und *knock out* Mutante PBL 2025ΔSSO3195

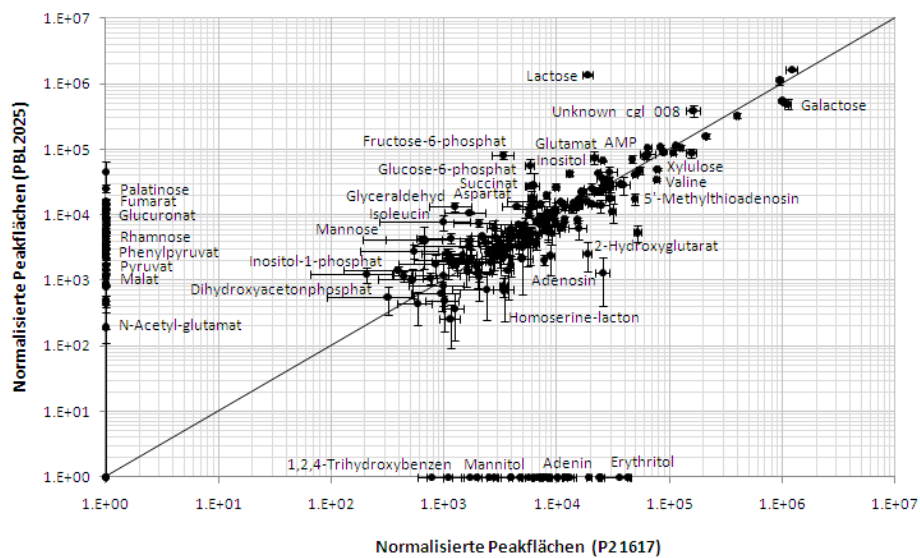
Nach einer Charakterisierung des Wachstums in **Kap. 3.1.4** soll das metabolische Profil des Stammes PBL 2025 und der *knock out* Mutante PBL 2025ΔSSO3195 genauer untersucht werden. Wie bereits erwähnt, ist PBL 2025 eine natürliche Deletionsmutante, welcher ein chromosomaler Abschnitt mit etwa 50 Genen fehlt, die größtenteils für den Abbau von  $\beta$ -9verknüpften Disacchariden codieren. In dieser Deletionsmutante wurde zusätzlich das Gen SSO3195, welches für die KDG-Kinase codiert, ausgeschaltet (Albers, unveröffentlicht). Die KDG-Kinase katalysiert die Umsetzung von KDG zu KDPG. Veränderungen im Stoffwechsel dieser Mutante könnten weitere Anhaltspunkte im Hinblick auf Anpassungsstrategien von *S. solfataricus* liefern. Zunächst werden die Unterschiede im metabolischen Profil zwischen dem Stamm P2 1617 und PBL 2025 erörtert. Anschließend werden die Auswirkungen der SSO3195-Mutation genauer betrachtet, indem PBL 2025 und PBL 2025ΔSSO3195 miteinander verglichen werden.

### 3.3.5.1 Vergleich von P2 1617 mit PBL 2025



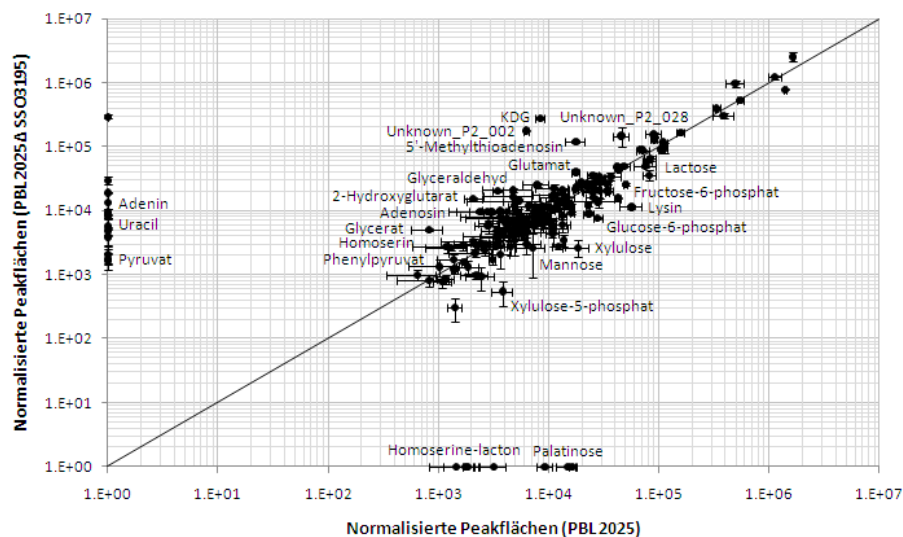
**Abb. 35** *TIC (total ion current)* von Zellextrakten von *S. solfataricus* P2 1617 (oben) und PBL 2025 (unten), kultiviert bei optimalen Wachstumsbedingungen.

Schon im *TIC* lassen sich Unterschiede zwischen *S. solfataricus* P2 1617 und PBL 2025 erkennen (**Abb. 35**). Die größte Veränderung weist der Lactose-Peak im PBL-Extrakt auf. Lactose ist im P2-Stamm auch vorhanden, jedoch im *TIC* kaum sichtbar. Zahlreiche weitere Unterschiede zwischen Metabolitkonzentrationen werden bei genauerer Auswertung aller identifizierten Metabolite anhand eines Streudiagramms sichtbar (**Abb. 36**).



**Abb. 36** Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen. Vergleich zwischen *S. solfataricus* P2 1617 und PBL 2025.

Zahlreiche Metabolite wurden ausschließlich im P2-Stamm (x-Achse) oder nur im PBL-Stamm (y-Achse) detektiert und deuten auf einige Unterschiede im Stoffwechsel der beiden Stämme hin (**Abb. 36**). Lediglich im P2-Stamm wurden einige Zuckeralkohole wie Erythritol und Mannitol bzw. Sorbitol detektiert. Weiterhin kommen auch Metabolite aus den Benzoat- und Butanoat-Wegen - 1,2,4-Trihydroxybenzen, 2-Hydroxyglutarat - und die Nucleotidverbindungen Adenin und Adenosin verstärkt im P2-Stamm vor. Der PBL-Stamm verfügt dagegen vermehrt über Intermediate des Zitronensäurezyklus. Metabolite des zentralen Kohlenhydratstoffwechsels, wie Pyruvat, Glyceraldehyd, Glucose-6-phosphat, Fructose-6-phosphat und Dihydroxyacetonphosphat weisen ebenfalls höhere Konzentrationen im PBL-Stamm auf. Auch AMP ist im PBL-Stamm hochreguliert. Insgesamt liegen neben Lactose Kohlenhydrate und Kohlenhydrat-Derivate, wie Glucuronat, Fructose, Mannose, Palatinose und Rhamnose, im PBL-Stamm erhöht vor.

3.3.5.2 Vergleich von PBL 2025 mit *knock out* Mutante PBL 2025 $\Delta$ SSO3195

**Abb. 37** Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen. Vergleich zwischen PBL 2025 und PBL 2025 $\Delta$ SSO3195.

Aus **Abb. 37** ist ersichtlich, dass die Intermediate des nicht-phosphorylierenden ED-Weges, KDG, Glyceraldehyd und Glycerat, in der Mutante in erhöhten Konzentrationen vorkommen. Insbesondere KDG ist um Faktor 32.69 erhöht (**Tab. 17**). Pyruvat konnte ausschließlich in der Mutante identifiziert werden. Glucose-6-phosphat und Fructose-6-phosphat liegen dagegen erniedrigt vor. Erhöht sind zudem Nukleosid-Verbindungen und Basen, wie z.B. Adenin, Adenosin und Uracil, sowie der Metabolit 5'-Methylthioadenosin. Zwei unbekannte Verbindungen sind ebenfalls in der Mutante stark hochreguliert. Trehalose ist dagegen um die Hälfte herunterreguliert. Auch andere Disaccharide wie Palatinose und Lactose, aber auch Monosaccharide, sind niedriger konzentriert.



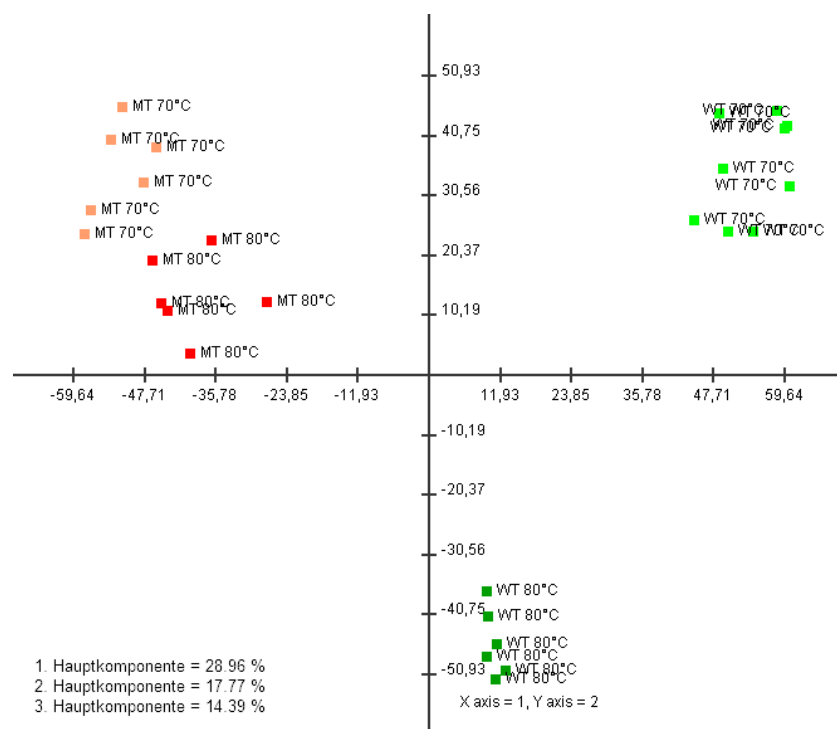
**Tab. 17** Vergleich der relativen Konzentrationen von identifizierten Metaboliten des zentralen Kohlenhydratstoffwechsels in PBL 2025 und PBL 2025 $\Delta$ SSO3195 (MT).

Metabolit	Faktor PBL 2025 $\Delta$ SSO3195/ PBL 2025	Relativer Standardfehler PBL 2025 [%]	Relativer Standardfehler MT [%]
Pyruvat	nur in MT identifiziert		$\pm 4.30$
KDG	32.69	$\pm 9.99$	$\pm 4.0$
Glyceraldehyd	3.19	$\pm 26.05$	$\pm 5.67$
Glycerat	3.11	$\pm 14.42$	$\pm 6.92$
Glucose	1.54	$\pm 3.17$	$\pm 15.28$
Citrat	1.14	$\pm 11.55$	$\pm 6.08$
Succinat	1.01	$\pm 40.54$	$\pm 17.78$
Dihydroxyacetonphosphat	0.72	$\pm 16.98$	$\pm 15.38$
Xylulose-5-phosphat	0.70	$\pm 7.98$	$\pm 13.07$
Malat	0.65	$\pm 12.77$	$\pm 15.99$
Fumarat	0.53	$\pm 27.99$	$\pm 41.77$
Trehalose	0.45	$\pm 7.11$	$\pm 12.83$
Fructose-6-phosphat	0.37	$\pm 7.19$	$\pm 3.10$
Glucose-6-phosphat	0.27	$\pm 9.39$	$\pm 4.46$

Nach Ausschalten der KDG-Kinase ist KDG in der Mutante erwartungsgemäß sehr viel höher konzentriert als im PBL 2025 (**Tab. 17**). Der Faktor beträgt 32.69. Glyceraldehyd und Glycerat weisen mit Faktor 3.19 und 3.11 wesentlich niedrigere Werte auf als KDG, sind aber deutlich höher konzentriert in der Mutante. Glucose, Dihydroxyacetonphosphat und Intermediate des Zitronensäurezyklus zeigen keine signifikanten Unterschiede, lediglich Malat ist mit Faktor 0.65 leicht herunterreguliert in der Mutante. Trehalose, Fructose-6-phosphat und Glucose-6-phosphat sind signifikant niedriger konzentriert als im PBL 2025. Die Signifikanz wurde mittels eines t-Tests mit einem Signifikanzniveau von 0.05 bestimmt. Metabolite mit nichtfarbigen Zahlen weisen keine signifikanten Unterschiede auf.

### 3.3.5.3 Vergleich von PBL 2025 und PBL 2025 $\Delta$ SSO3195 bei 70 °C und 80 °C

Nach der Analyse des Metaboloms von Wildtyp P2 1617 bei unterschiedlichen Temperaturen soll nun das Verhalten des PBL 2025 und der *knock out* Mutante PBL 2025 $\Delta$ SSO3195 bei Temperaturen unterhalb des Optimums auf Stoffwechselebene genauer analysiert werden. Für das Experiment wurde neben 80 °C eine Kultivierungstemperatur von 70 °C gewählt. Pro Kultur wurden mindestens 3 biologische Replikate eingesetzt. Zur Reduzierung der Dimensionen werden alle Proben nachfolgend in einer Hauptkomponentenanalyse dargestellt.

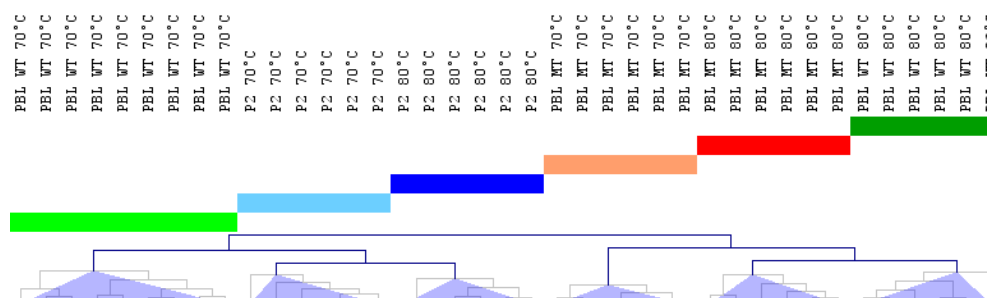


**Abb. 38** Darstellung der PBL 2025 (WT) und PBL 2025 $\Delta$ SSO3195-Proben (MT) bei 70 °C und 80 °C in einer Hauptkomponentenanalyse (PCA). Die grünen Punkte symbolisieren den PBL 2025-Stamm bei 80 °C (dunkelgrün) und bei 70 °C (hellgrün). Die roten Punkte stellen die PBL 2025 $\Delta$ SSO3195-Mutante bei 80 °C (dunkelrot) und bei 70 °C (hellrot) dar. Die 1. und 2. Komponente der PCA beschreiben zusammen eine Gesamtvarianz von 47 %, während die ersten 3 Komponenten 61 % aufweisen.

**Abb. 38** zeigt eine deutliche Separierung der PBL 2025- und PBL 2025 $\Delta$ SSO3195-Proben

bei 70 °C und 80 °C. Dabei ist die Distanz zwischen den PBL 2025-Proben bei 70 °C und 80 °C größer als zwischen den PBL 2025 $\Delta$ SSO3195-Proben bei beiden Temperaturen. Eine genauere Analyse zeigte, dass die Metabolite Xylulose, Glucose-6-phosphat, Unknown-PBL-005, Unknown-PBL-022 und Unknown#bth-pae-056 den größten Einfluss auf die Vektoren und damit auf die Trennung der Proben hatten.

Zur Verdeutlichung der Differenzen bzw. Ähnlichkeiten der hier angewandten Organismenstämme werden nachfolgend der PBL 2025 und PBL 2025 $\Delta$ SSO3195 mit dem P2 1617 bei 70 °C und 80 °C in einer Hierarchischen Clusteranalyse (HCA) dargestellt.

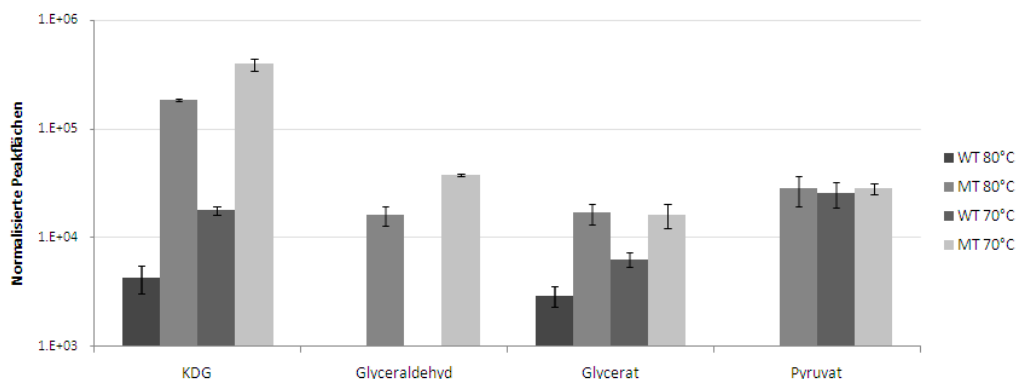


**Abb. 39** Darstellung der P2 1617-, PBL 2025- (WT) und PBL 2025 $\Delta$ SSO3195-Proben (MT) bei 70 °C und 80 °C in einer Hierarchischen Clusteranalyse (HCA).

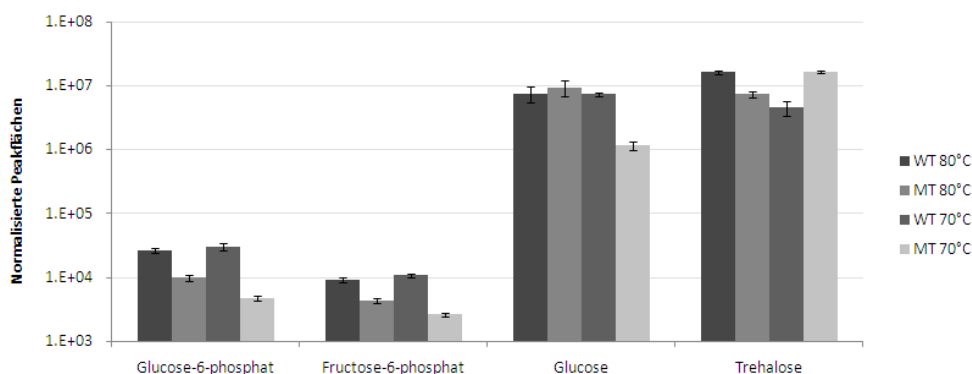
Beim Vergleich des P2 1617, PBL 2025 und PBL 2025 $\Delta$ SSO3195 bei 70 °C und 80 °C divergieren die Proben in zwei Hauptcluster (**Abb. 39**). Das 1. Hauptcluster beinhaltet die Proben des P2-Stammes bei beiden Temperaturen sowie die Proben des PBL 2025-Stammes bei 70 °C, während das 2. Hauptcluster die PBL 2025 $\Delta$ SSO3195-Proben bei beiden Temperaturen sowie die Proben des PBL 2025-Stammes bei 80 °C integriert. Das erste Hauptcluster wird weiter in den P2-Stamm bei 70 °C und 80 °C auf der einen Seite, sowie in den PBL 2025 bei 70 °C auf der anderen Seite aufgetrennt, während das 2. Hauptcluster einerseits in den PBL 2025 und PBL 2025 $\Delta$ SSO3195 bei 80 °C und andererseits in den PBL 2025 $\Delta$ SSO3195 bei 70 °C divergiert.

### Metabolite des zentralen Kohlenhydratstoffwechsels

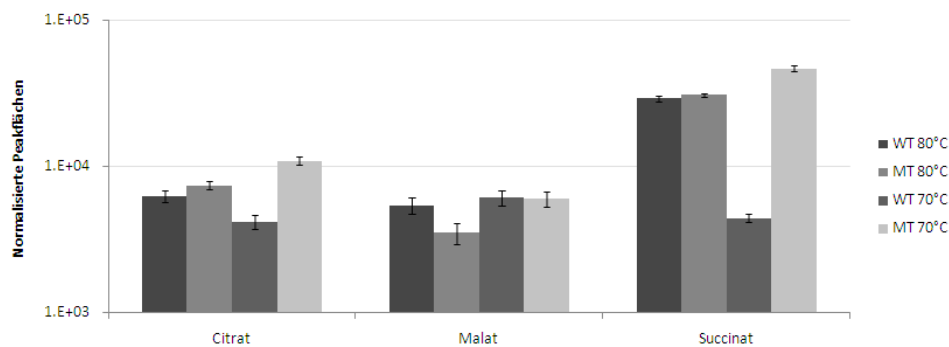
Aufgrund der Gewichtung dieser Arbeit auf den zentralen Kohlenhydratstoffwechsel werden alle beteiligten identifizierten Metabolite, die bei dem Vergleich der PBL 2025 und PBL2025 $\Delta$ SSO3195 detektiert wurden, anhand von Balkendiagrammen (Abb. 40, 41 und 42) dargestellt und verglichen.



**Abb. 40** Logarithmische Darstellung der mittleren relativen Konzentration von KDG, Glyceraldehyd, Glycerat und Pyruvat in PBL 2025 (WT) und PBL 2025 $\Delta$ SSO3195 (MT) bei 70 °C und 80 °C.



**Abb. 41** Logarithmische Darstellung der mittleren relativen Konzentration von Glucose-6-phosphat, Fructose-6-phosphat, Glucose und Trehalose in PBL 2025 (WT) und PBL 2025 $\Delta$ SSO3195 (MT) bei 70 °C und 80 °C.



**Abb. 42** Logarithmische Darstellung der mittleren relativen Konzentration von Citrat, Malat und Succinat in PBL 2025 (WT) und PBL 2025 $\Delta$ SSO3195 (MT) bei 70 °C und 80 °C.

In den **Abb. 40, 41** und **42** lässt sich einerseits der Effekt der Mutation und zusätzlich der Einfluss der Temperatur auf den zentralen Kohlenhydratstoffwechsel feststellen. Anhand von KDG (**Abb. 40**) wird deutlich, dass das Intermediat sowohl aufgrund des *knock outs* der KDG-Kinase als auch durch die niedrigere Kultivierungstemperatur akkumuliert. Auch Glyceraldehyd und Glycerat zeigen dieses Muster. Lediglich die Konzentration von Glycerat steigt in der Mutante bei der niedrigeren Temperatur nicht an. Glyceraldehyd wurde nur in der Mutante detektiert. Pyruvat ist im PBL 2025 bei 70 °C und in der Mutante bei beiden Temperaturen stark erhöht gegenüber PBL 2025 bei 80 °C, wo Pyruvat unter dem Detektionslimit liegt.

Der umgekehrte Effekt ist bei Glucose-6-phosphat und Fructose-6-phosphat in der Mutante zu beobachten (**Abb. 41**). Die Konzentration ist bei 70 °C niedriger als bei 80 °C. Im PBL 2025 bleiben die Konzentrationen dagegen gleich. Weiterhin zeigt Glucose in der Mutante bei 70 °C eine Veränderung: Die Konzentration ist geringer im Vergleich zur Mutante bei 80 °C und zur Konzentration im PBL 2025 bei beiden Temperaturen. Trehalose verhält sich im PBL 2025 und der Mutante entgegengesetzt. Im PBL 2025 sinkt die Konzentration bei 70 °C, in der Mutante steigt sie dagegen. Metabolite des Zitronensäurezyklus zeigen ebenfalls Veränderungen (**Abb. 42**): Citrat, Malat und Succinat weisen erhöhte Konzentrationen in der Mutante bei 70 °C im Vergleich zu 80 °C auf, während Citrat im PBL 2025 bei 70 °C sinkt, Succinat jedoch steigt. Malat zeigt keine

signifikante Veränderung im PBL 2025.

In **Tab. 18** werden alle signifikant veränderten Metabolite außerhalb des zentralen Kohlenhydratstoffwechsels für die Vergleiche von PBL 2025 und PBL 2025 $\Delta$ SSO3195 bei 70 °C und 80 °C in alphabetischer Reihenfolge dargestellt. In der Mutante sind bei 70 °C alle identifizierten Aminosäuren bis auf Glycin und Serin hochreguliert. Im PBL 2025 dagegen sind lediglich Homoserin, Isoleucin, Lysin und Valin erhöht, während Aspartat, Glycin und Threonin in niedrigeren Konzentrationen vorliegen. In beiden Stämmen sind Galactosamin, Xylulose und 5'-Methylthioadenosin bei 70 °C erhöht. In signifikant niedrigeren Konzentrationen kommen dagegen 4-Hydroxyphenylacetat und Glycerol-3-phosphat vor. Die Verbindungen Homoserin-lacton und Mannitol wurden sowohl im PBL 2025 als auch in der Mutante ausschließlich bei 70 °C detektiert. Viele Metabolite, wie z.B. Inositol oder Putrescin, weisen gegensätzliche Veränderungen zwischen PBL 2025 und PBL 2025 $\Delta$ SSO3195 bei 70 °C auf.

**Tab. 18** Vergleich der relativen Konzentrationen von identifizierten Metaboliten bei 70 °C und bei 80 °C in PBL 2025 und PBL 2025ΔSSO3195 (MT).

Metabolit	Faktor PBL 2025 70 °C/80 °C	Rel. Standardfehler PBL 2025 80 °C [%]	Rel. Standardfehler PBL 2025 70 °C [%]	Faktor Mutante 70 °C/80 °C	Rel. Standardfehler Mutante 80 °C [%]	Rel. Standardfehler Mutante 70 °C [%]
2-Hydroxyglutarat	2.77	± 15.70	± 11.66	0.77	± 3.48	± 9.36
4-Hydroxyphenylacetat	0.36	± 21.22	± 12.52	0.39	± 2.76	± 10.39
5'-Methylthioadenosine	1.54	± 9.50	± 3.80	2.54	± 3.98	± 3.62
AMP	0.51	± 13.87	± 14.82	0.63	± 12.35	± 14.96
Alanin	1.01	± 4.66	± 9.17	1.79	± 3.38	± 12.99
Aspartat	0.42	± 7.23	± 14.86	3.81	± 40.26	± 13.31
Fructose	10.29	± 6.07	± 4.63	0.61	± 10.74	± 44.85
Galactosamin	3.78	± 9.79	± 7.43	2.81	± 6.91	± 2.68
Glutamat	0.96	± 15.02	± 16.48	2.91	± 15.03	± 22.76
Glycerol-3-phosphat	0.25	± 4.55	± 19.57	0.17	± 3.27	± 2.98
Glycin	0.44	± 7.18	± 6.50	0.69	± 11.31	± 19.97
Homoserin	3.03	± 25.00	± 15.45	4.02	± 26.80	± 8.09
Homoserin-lacton	nur bei 70 °C		± 6.49	nur bei 70 °C		± 4.81
Inositol	1.27	± 3.89	± 4.59	0.67	± 2.29	± 2.76
Inositol-1-phosphat	0.83	± 4.65	± 11.19	0.61	± 6.78	± 10.76
Isoleucin	3.37	± 10.10	± 7.22	6.75	± 48.04	± 10.12
Lactose	0.76	± 5.00	± 14.47	2.33	± 10.67	± 2.1
Lysin	2.43	± 13.15	± 14.10	2.49	± 6.82	± 8.27
Mannitol	nur bei 70 °C		± 4.36	nur bei 70 °C		± 37.60
Prolin	1.75	± 36.31	± 30.75	9.91	± 20.84	± 14.09
Putrescin	2.10	± 6.85	± 7.83	0.38	± 9.63	± 11.35
Threonin	0.76	± 9.09	± 4.25	1.47	± 9.75	± 5.10
Valin	11.83	± 8.06	± 10.03	2.99	± 12.95	± 6.50
Xylulose	2.38	± 10.95	± 3.98	2.20	± 25.36	± 10.78

### 3.3.6 Unbekannte Verbindungen in *S. solfataricus*

Viele der Peaks, die in einem GC-MS-Chromatogramm eines Zellextrakts vorkommen, können nicht identifiziert werden, d.h. ihr spezifisches Massenspektrum ist nicht in der verwendeten Stoffbibliothek hinterlegt. Für die Analyse von neuen Organismen ist es daher von besonderer Bedeutung, eine ungerichtete Metabolomanalyse (*untargeted*) durchzuführen, unbekannte Peaks zu nummerieren und auf Reproduzierbarkeit zu untersuchen. Auf diese Weise können potenzielle neue Metabolite für einen bestimmten Organismus entdeckt werden.

**Tab. 19** fasst einige ausgewählte unbekannte Verbindungen (*Unknowns*) aus dem Zellextrakt von *S. solfataricus* zusammen. Es handelt sich ausschließlich um Verbindungen, die in mindestens 66.67 % aller gemessenen Proben aus insgesamt 55 biologischen Replikaten vorkommen. Dargestellt sind die durchschnittlichen Retentionszeiten und -indices, die Hauptmassenspuren, der relative Standardfehler, die Unterschiede innerhalb der Experimente und mögliche Identifizierungsvorschläge für die einzelnen *Unknowns*. Die ersten 5 *Unknowns* wurden ursprünglich in mesophilen Bakterien detektiert und waren bereits in der verwendeten Stoffbibliothek hinterlegt, konnten jedoch auch in *S. solfataricus* reproduzierbar identifiziert werden und zeigten eine biologische *response* in den hier durchgeführten Experimenten. Die nachfolgenden 6 *Unknowns* wurden vermehrt im P2 1617 detektiert, zeigen jedoch zum Teil auch im PBL-Stamm signifikante Unterschiede. Die letzten 4 *Unknowns* wurden in vergleichsweise hohen Konzentrationen im PBL-Stamm detektiert. Unknown-PBL-022 kam nur in der *knock out* Mutante PBL 2025ΔSSO3195 vor, während Unknown-PBL-025 ausschließlich im PBL 2025 detektiert worden ist. Insgesamt konnten mithilfe zusätzlicher Stoffbibliotheken und durch Vergleiche von Massenspektren 8 der *Unknowns* möglichen Stoffklassen zugeteilt werden.



**Tab. 19** Reproduzierbare unbekannte Verbindungen in Zellextrakten von *S. solfataricus* P2 1617, PBL 2025 und PBL 2025ΔSSO3195.

Bezeichnung	Ø-RT [min]	Ø-RI	Dominante Massenspuren	Vorkommen	Rel. Standardfehler [%]	Unterschiede	Mögliche Stoffklasse bzw. Verbindung
Unknown-pae-056	25.59	1170	217, 218, 232	100 %	± 3.97	65 °C, 70 °C ↓ 88 °C ↑	Malat-Derivat
Unknown-pae-065	19.78	1467	98, 247, 248	100 %	± 6.68	65 °C, 70 °C ↑	
Unknown-pae-066	6.36	960	171,17	66.67 %	± 2.32	70 °C ↑	
Unknown-cgl-008	14.46	1244	110, 241, 336	100 %	± 15.60	65 °C, 70 °C ↓	Zuckeralkohol
Unknown-cgl-046	24.23	1652	271,17	78.18 %	± 6.90	65 °C, 70 °C ↓	
Unknown-P2-002	27.20	1856	217, 335	78.18 %	± 10.99	70 °C ↑ 88 °C ↓	
Unknown-P2-009	21.90	1570	157, 275	100 %	± 10.31	70 °C ↑ 88 °C ↓	Malat-Derivat
Unknown-P2-011	16.31	1323	133, 219, 233	87.27 %	± 4.38	65 °C, 70 °C ↓ 88 °C ↓	Organische Säure
Unknown-P2-012	41.99	2928	204, 331, 361	100 %	± 6.78	65 °C, 70 °C ↑	Zweifachzucker
Unknown-P2-016	31.04	2093	86, 174, 175	78.18 %	± 5.10	65 °C, 70 °C ↓	Polyamin-Derivat, evtl. Spermin oder Norspermin
Unknown-P2-113	33.30	2239	144, 156, 160	72.73 %	± 5.18	88 °C ↓	Polyamin-Derivat, evtl. Norspermidin (Caldin)
Unknown-PBL-002	21.48	1548	169, 197, 271	92.98 %	± 4.48	PBL 2025ΔSSO3195 ↑	Tyrosin-Derivat
Unknown-PBL-005	25.66	1777	129, 155, 205	77.19 %	± 5.14	PBL 2025ΔSSO3195 ↑	
Unknown-PBL-022	27.98	1903	103, 128, 218	80.70 %	± 4.85	PBL 2025ΔSSO3195 ↑	
Unknown-PBL-025	44	3092	271, 315	66.67 %	± 22.58	PBL 2025 ↑	

## 4 Diskussion

Im ersten Teil werden mikrobiologische Aspekte behandelt und die Etablierung der Kultivierungsbedingungen in Schüttelkolben und im Bioreaktor diskutiert. Weiterhin wird die Optimierung der Aufarbeitungsmethode für *Sulfolobus solfataricus* zusammengefasst. Schließlich wird das metabolische Profil von *S. solfataricus* vorgestellt und mit mesophilen Organismen verglichen. Im Hinblick auf mögliche Anpassungsstrategien des Stoffwechsels werden Gegenüberstellungen der Metabolomdaten unterschiedlicher Temperaturexperimente diskutiert, darunter die kontinuierliche Kultivierung bei Temperaturen unterhalb des Optimums sowie Stressantworten nach einem plötzlichen Kälte- und Hitzeschock. Die Metabolomdaten werden zum Teil mit vorliegenden Transkriptom- und Proteomdaten verglichen und Übereinstimmungen diskutiert. Weiterhin werden Ergebnisse von Metabolomdaten einer *knock out*-Mutante von *S. solfataricus* behandelt und mit dem Wildtyp verglichen. Abschließend werden Veränderungen im Stoffwechsel der Mutante bei Kultivierungen unterhalb des Temperaturoptimums diskutiert und in den Temperaturvergleich des P2-Stammes miteinbezogen.

### 4.1 Etablierung der Wachstumsbedingungen und Bestimmung mikrobiologischer Parameter

Zu Beginn war es notwendig, wichtige Parameter für die Kultivierung, wie z.B. bewährte Schüttelinkubatoren und Kolben für die Hocht看peratur, Schüttelgeschwindigkeit für den Sauerstoffeintrag, Animpfmethode und Kulturmedium zu testen und anhand des Wachstums des Organismus festzustellen, welche die geeignetsten Bedingungen sind. Die Zusammensetzung des Kulturmediums wurde von den Kooperationspartnern des SulfoSys-Projekts bereitgestellt (siehe **Kap. 2.4**). Alle beteiligten Gruppen einigten sich auf ein definiertes Minimalmedium mit Glucose als einziger Kohlenstoffquelle. Dies war essentiell, da sich der Schwerpunkt der Untersuchungen auf die zentralen Abbaupfade von Glucose konzentriert. Anschließend wurden mikrobiologische Parameter wie spezifische Wachstumsrate, Konzentration der Biotrockenmasse und Kohlenstoffeinbau in die

Biomasse bestimmt. Für das SulfoSys-Projekt war es außerdem Voraussetzung, eine Kultivierung im Bioreaktor zu etablieren.

#### **4.1.1 Etablierung der Kultivierung in Schüttelkolben**

Die Hochtemperatur und der lange Kultivierungszeitraum bei der Anzucht von *S. solfataricus* stellten ein Problem für herkömmliche Erlenmeyerkolben dar. Um den starken Verdunstungseffekt zu minimieren, wurden speziell angefertigte Langhalskolben verwendet. Zusätzlich bewirkte der Wechsel von einem offenen Ölbad-Schüttler zu einem geschlossen Inkubationsschüttler eine Reduzierung der Verdunstung und erhöhte die Reproduzierbarkeit des Wachstums.

Bei der Kultivierung von *S. solfataricus* wurde die Hauptkultur direkt mit einem 200  $\mu$ L Glycerinstock angeimpft und konnte ohne weitere Umimpfschritte für die Metabolomanalyse verwendet werden. Diese Methode erwies sich aus mehreren Gründen als sinnvoll. Zum einen ist die Anzucht von hyperthermophilen Organismen auf Agar-Platten nur erschwert möglich, weshalb eine Vorkultivierung einzelner Kolonien nicht möglich war und stets ein ganzer Glycerinstock zum Animpfen einer Kultur verwendet werden musste. Da die Zellen des Glycerinstocks ebenfalls Glucose als C-Quelle verwertet haben, konnte auf Vorkultivierungen zur Adaptation des Mediums verzichtet werden. Dies war außerdem von Vorteil, da genetische Störungen so gering wie möglich gehalten werden konnten. Mit jeder Neukultivierung steigen die Mutationsraten in *S. solfataricus* (Martusewitsch et al., 2000). Die angewandte Art der Zellanzucht ermöglichte zudem eine große Zeitersparnis, da eine Vorkultivierung etwa 3 Tage – bei 65 °C sogar 6 Tage – in Anspruch nehmen würde.

#### **4.1.2 Kultivierung des P2 1617 bei unterschiedlichen Temperaturen**

Das Wachstum bei Temperaturen unterhalb des Optimums (65 °C und 70 °C) verglichen mit dem Optimum (80 °C) verhielt sich wie erwartet (**Kap. 3.1.1, Abb. 12**). Bei 80 °C wies *S. solfataricus* eine spezifische Wachstumsrate von 0.055  $h^{-1}$  und eine Verdopplungszeit von 12.6 h auf. Bei 70 °C war er dagegen mit einer Wachstumsrate von 0.033  $h^{-1}$  und einer Verdopplungszeit von 21 h fast nur halb so schnell wie bei Optimaltemperatur. Wurde die Kultivierungstemperatur um weitere 5 °C auf 65 °C herabgesetzt, benötigte der

Organismus mit einer Wachstumsrate von nur  $0.015\ h^{-1}$  sogar 46.2 h, um sich zu verdoppeln. Das verlangsamte Wachstum bei Temperaturen von 10 °C und 15 °C unterhalb der Optimaltemperatur des Organismus kann mit einer allgemeinen Reduzierung der Geschwindigkeit aller chemischen Prozesse erklärt werden. Generell gilt, dass mit steigender Temperatur alle chemischen und enzymatischen Reaktionen in der Zelle schneller ablaufen, wodurch auch die Wachstumsrate steigt. Wie bei den meisten Mikroorganismen ist bei *S. solfataricus* die Spanne zwischen Temperaturminimum und -optimum viel größer als zwischen Temperaturoptimum und -maximum. Insgesamt erstreckt sich bei *S. solfataricus* der Bereich, in dem Wachstum noch beobachtet werden kann, zwischen 60 °C und 90 °C. Da der Organismus in seiner natürlichen Umgebung wahrscheinlich teilweise starken Temperaturschwankungen ausgesetzt ist, beispielsweise an Oberflächen von heißen Solfataren, muss er wirkungsvolle Anpassungsstrategien an solche Veränderungen aufweisen können.

Auffällig am Wachstumsverhalten von *S. solfataricus* war eine vergleichsweise kurze stationäre Phase. Die Wachstumskurve knickte schnell ab und der Organismus ging fast nahtlos von der Wachstums- in die Absterbephase über. Anhand einer logarithmischen Auftragung konnte ermittelt werden, dass exponentielles Wachstum bei 80 °C etwa bis zur 90. Stunde andauerte. Es folgte eine Übergangsphase, während der sich die spezifische Wachstumsrate verringerte. Dies geschieht wahrscheinlich aufgrund einer Nährstoffabnahme und Zunahme von Abfallprodukten, die das Wachstum immer mehr hemmen. 20 Stunden später trat schließlich die stationäre Phase ein, in der kein Wachstum erkennbar war, da die Zahl gebildeter Zellen gleich der Anzahl absterbender Zellen war. Diese Phase dauerte bei *S. solfataricus* jedoch nur 10-15 Stunden, was in etwa einer Generationszeit bei der höchsten Wachstumsrate entspricht (siehe oben). Danach sank die Zelldichte rapide ab.

### **4.1.3 Wachstumskurven von PBL 2025 und PBL 2025 $\Delta$ SSO3195 im Vergleich zum P2 1617**

Zusätzlich zu den Experimenten mit dem P2 1617-Stamm wurde eine *knock out* Mutante von *S. solfataricus* näher untersucht. Der PBL 2025 $\Delta$ SSO3195, der einen *knock out* des für die KDG-Kinase codierenden Gens aufweist, leitet sich von der natürlichen Deletionsmutante PBL 2025 ab. Diesem Stamm fehlt ein Genabschnitt mit etwa 50 Genen. Aus

diesem Grund wird erwartet, dass der PBL-Stamm sich auch auf Stoffwechselebene vom P2-Stamm unterscheiden könnte. Dafür war es zunächst notwendig, das Wachstumsverhalten im Vergleich zum P2-Stamm zu untersuchen.

Der PBL 2025-Stamm zeigte einen ähnlichen Wachstumsverlauf wie der P2-Stamm, allerdings wies er eine deutlich höhere Wachstumsrate auf (**Kap. 3.1.4, Abb. 14**). Mit  $0.095\ h^{-1}$  hatte er bei 80 °C eine Verdopplungszeit von nur 7.2 h, im Gegensatz zu 12.6 h beim P2-Stamm. Die *knock out*-Mutante war mit einer Wachstumsrate von  $0.091\ h^{-1}$  nur etwas langsamer als der PBL 2025. Bemerkenswert ist, dass beide PBL-Stämme bei 70 °C höhere Wachstumsraten aufweisen als der P2-Stamm bei 80 °C. Jedoch ist unklar, was der Grund für diesen Unterschied im Wachstumsverhalten sein könnte. Weitere Anhaltspunkte dazu kann eine Analyse des Metaboloms beider Stämme liefern. Dies wird in **Kap. 4.3.5** diskutiert. Beim Vergleich des Wachstums des PBL 2025 und der *knock out*-Mutante PBL 2025 $\Delta$ SSO3195 kann jedoch konstatiert werden, dass die gezielte Mutation des SSO3195-Gens keinen Einfluss auf die zum Überleben notwendigen physiologischen und biochemischen Vorgänge und somit auch nicht auf die Wachstumsgeschwindigkeit des Organismus hat. Das Gen codiert für das Enzym KDG-Kinase, die das Schlüsselenzym im semi-phosphorylierenden Weg des verzweigten Entner-Doudoroff-Weges (ED) darstellt. Die KDG-Kinase phosphoryliert das Intermediat KDG und eröffnet der Zelle damit die Möglichkeit, einen alternativen Weg zum nicht-phosphorylierenden Zweig für den Kohlenhydratstoffabbau zu beschreiten. Da das Wachstumsverhalten der Mutante nicht signifikant vom PBL 2025 abweicht, kann davon ausgegangen werden, dass der nicht-phosphorylierende Zweig des ED-Weges allein ausreicht, um Glucose effektiv zu verstoffwechseln.

#### 4.1.4 Etablierung der Kultivierung im Bioreaktor

Um Kultivierungsparameter wie Temperatur, pH-Wert und Sauerstoffeintrag kontrollieren zu können und außerdem ein größeres Kulturvolumen als in Schüttelkolben zu erzielen, ist eine Zellanzucht in einem Bioreaktor unumgänglich. Das Ziel eines größeren Kulturvolumens war insbesondere im Rahmen des SulfoSys-Projekts von Bedeutung, da die zentrale Fermentationsstelle von Wageningen (Niederlande) nach Braunschweig verlegt worden war. Eine exakte und reproduzierbare Metabolomanalyse erfordert erfahrendes und präzises Handeln, außerdem Schnelligkeit und die sofortige Verarbeitung der Proben bis

zum Trockenzustand. Variationen in der Laborausstattung sowie längere Unterbrechungen der Prozedur aufgrund der Verschickung von Proben wirkten sich negativ auf die Qualität der Metabolomdaten aus. Im Gegensatz dazu setzten die Protokolle der Kooperationspartner keine so strenge Behandlung der Proben voraus und konnten problemlos aus Braunschweig verschickt werden.

Trotz vieler Schwierigkeiten in der Umsetzung einer Maßstabsvergrößerung von mikrobiellen Kultivierungen ist es gelungen, eine Kultivierung von *S. solfataricus* in einem 5 L-Bioreaktor zu etablieren und damit ein *scale up* von 0.1 L auf 3 L zu erzielen (30fach). Für den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *batch*-Prozess wurden alle Nährstoffe proportional an das größere Volumen angepasst. Die Temperatur wurde mithilfe eines Doppelmantel-Temperiersystems reproduzierbar und konstant bei der jeweils eingestellten Temperatur gehalten. Regelmäßige Kontrollen mit einem externen Thermometer bestätigten dies. Die Start-Zelldichte wurde mit OD<sub>600</sub> 0.02 so gewählt wie im kleinen Maßstab. Die ausgewählte Animpfdichte war für die Zellen hoch genug, um schnell exponentielles Wachstum zu erreichen und niedrig genug, dass Nebenprodukte aus der Vorkultur stark genug verdünnt wurden. Voraussetzung war allerdings eine junge Vorkultur. Das Wachstum wurde zum Teil erheblich verzögert, wenn das Inokulum aus Zellen, die sich in der stationären Phase befanden, bestand (Daten hier nicht gezeigt). Bei einer optischen Dichte von 0.7 in der Vorkultur waren somit 85.7 mL nötig, um 3 L auf OD<sub>600</sub> 0.02 anzuimpfen. Das Animpfen der Kultur fand ohne vorangehende Aufkonzentrierungen der Vorkultur statt. Da stets die gleiche C-Quelle verwendet wurde, stellte dies kein Problem dar. Mit dem direkten Überführen der Vorkultur konnte eine unnötige Abkühlung sowie Sauerstoffstress vermieden werden.

Die Kultivierung auf verschiedenen Substraten hat einen enormen Einfluss auf den pH-Wert des Mediums. Vorversuche haben gezeigt, dass bei Wachstum in Komplexmedium aus Hefeextrakt der pH-Wert während des gesamten Kultivierungsverlaufs von pH 3.5 auf pH 5.5 ansteigt, während er bei Wachstum in Minimalmedium mit Glucose als C-Quelle von pH 3.5 bis pH 1.8 absinkt (Daten nicht gezeigt). Studien belegen, dass der Anstieg des pH-Wertes in Komplexmedium durch überschüssige Ammonium-Ionen hervorgerufen wird (Park und Lee, 1998). Das Absinken des pH-Wertes bei Wachstum in Minimalmedium könnte ein Indiz für die Sekretion saurer Verbindungen sein. Aller Wahrscheinlichkeit nach verursacht jedoch in diesem Fall die Abnahme von Ammonium-Ionen im Medium, die dem

Organismus in Form von Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle dienen, das Absinken des pH-Wertes (Park und Lee, 1998). Aufgrund der nur schwachen Pufferwirkung des *S. solfataricus*-Minimalmediums können pH-Verschiebungen schon durch relativ geringe Änderungen der Ionenkonzentration hervorgerufen werden. Aus diesem Grund ist trotz der relativ breiten pH-Toleranz von *S. solfataricus* eine pH-Kontrolle während des Fermentationsverlaufs von großer Wichtigkeit. Der pH-Wert wurde über die gesamte Kultivierung bei konstanten 3.5 gehalten. Regelmäßige externe Messungen verifizierten dies. Insgesamt wurden während einer Fermentation ca. 50 mL 1 mol · L<sup>-1</sup> NaOH ins Medium gefördert. Gegen Ende der stationären Phase musste der Kultur Säure zugepumpt werden, da das Medium basisch wurde. Ungefähr 5 mL 0.5 mol · L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wurden insgesamt verbraucht (siehe Anhang, **Abb. 49**). Dies könnte ein Beleg dafür sein, dass kaum noch Wachstum stattfindet und die Zahl der absterbenden Zellen über der der lebenden liegt. Dadurch werden zum einen keine Ammonium-Ionen mehr verbraucht bzw. keine sauren Verbindungen mehr sekretiert, und zum anderen sind wahrscheinlich viele Zellen lysiert und bewirken durch das neutrale Cytosol bzw. basische Metabolite eine Verschiebung des pH-Wertes ins Basische.

Während bei Maßstabsvergrößerungen in den meisten Fällen ein zu geringer Sauerstoffeintrag prozesslimitierend wirkt und zu Problemen führt, war im Fall von *S. solfataricus* das Gegenteil der Fall. Ein zu großer anfänglicher Sauerstoffeintrag limitierte das Wachstum des mikroaerophilen Organismus. Zu Beginn wurde mit einer Begasungsrate von 1 L/min und einer Rührergeschwindigkeit von 300 rpm kultiviert (siehe **Kap. 3.1.5**). Wie in **Abb. 15** zu erkennen ist, konnte nur geringes Zellwachstum festgestellt werden. Erst nachdem die Start-Begasungsrate auf ein Zehntel (0.1 L/min) und die Rührergeschwindigkeit auf ein Drittel (100 rpm) reduziert worden waren, erreichten die Zellen exponentielles Wachstum und eine Zelldichte vergleichbar mit Kultivierungen im Schüttelkolben. Studien belegen, dass *S. solfataricus* ab einer Sauerstoffkonzentration von 35 % in der Begasungsluft nicht mehr wachsen kann (Simon et al., 2009). Obwohl im Rahmen dieser Arbeit nicht die O<sub>2</sub>-Konzentration in der Begasungsluft (21 %), sondern lediglich die Begasungsrate verändert worden ist, zeigte dies deutliche Auswirkungen auf das Wachstum. Zwar verfügt *S. solfataricus* über ein effektives System, um oxidativen Stress zu umgehen (Maaty et al., 2009), jedoch wirken zu hohe Konzentrationen toxisch und führen zu irreparablen Schäden der DNA und anderen Makromolekülen der Zelle. Da

der Sauerstoffeintrag während der Fermentation geregelt und der  $pO_2$ -Wert konstant gehalten werden musste, stiegen die Begasungsrate und Rührergeschwindigkeit mit fortschreitendem Zellwachstum an und erreichten am Schluss schließlich 1 L/min und 300 rpm (siehe Anhang, **Abb. 49**). Wahrscheinlich ist der  $O_2$ -Eintrag zu Beginn ein kritischer Punkt bei der *S. solfataricus*-Kultivierung. Gleichzeitig könnten durch die hohe Rührergeschwindigkeit zu große Scherkräfte auf den Organismus ausgeübt worden sein, welche mit der Minimierung aufgehoben werden. Viele hyperthermophile Organismen weisen eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Scherstress auf (Holst et al., 1997). Um zu große Scherkräfte zu Beginn der Kultivierung zu vermeiden, wurde bei der Kaskade für die  $pO_2$ -Kontrolle mit einer Erhöhung der Begasungsrate, anstatt wie bei *C. glutamicum* mit einer Erhöhung der Rührergeschwindigkeit, begonnen (**Tab. 12**). Erstaunlich ist jedoch, dass der Organismus auch bei gleichbleibendem Sauerstoffeintrag während der gesamten Kultivierung ein vergleichbar gutes Wachstum aufwies. Neueste Untersuchungen haben gezeigt, dass *S. solfataricus* ein effizientes Anpassungssystem hat, das schwankende  $O_2$ -Konzentrationen kompensieren kann (Simon et al., 2009). Bei sehr niedrigen  $O_2$ -Konzentrationen nutzt die Zelle  $O_2$  effektiver, bzw. bildet Enzyme mit höheren Affinitäten zu  $O_2$ .

Um ausschließen zu können, dass bei gleichbleibendem Sauerstoffeintrag eine Limitierung eintritt, wurde die Lactatkonzentration in der Zelle genauer untersucht. Eine erhöhte Lactatkonzentration ist ein Indiz für Sauerstoffmangel. Vergleichende Metabolomdaten zeigten jedoch keine Unterschiede in der Lactatkonzentration zwischen Proben mit und ohne Erhöhung des Sauerstoffeintrags (Daten hier nicht gezeigt).

Um zu ermitteln, ob die Kohlenstoff- und Energiequelle den limitierenden Faktor bei der Kultivierung darstellt, wurden verschiedene Anfangskonzentrationen von Glucose getestet und der Verbrauch mittels einer Glucosekonzentrationsbestimmung (**Kap. 2.5.5.1**) in den Zellüberständen ermittelt. In Vorversuchen wurden unterschiedliche Glucosekonzentrationen zwischen 2 g/L und 16 g/L getestet. Dabei stieg die erreichte Endkonzentration der Biomasse mit der Glucosekonzentration. *S. solfataricus* wies bei einer Glucosekonzentration von 4 g/L eine End-OD von 1.4 auf, während er bei der 4fachen Menge seine Zelldichte mit einer End-OD von 2.2 um ein Drittel erhöhte (**Abb. 15**). Tatsächlich belegen die Konzentrationsmessungen einen kompletten Verbrauch der Glucose nach Erreichen der stationären Phase bei einer Anfangskonzentration von 4 g/L, während bei der



4fachen Menge in der stationären Phase noch 6.1 g/L Glucose nachweisbar waren. Dies beweist, dass in dem Fall andere Faktoren, wie Nebenprodukte oder ein Mangel an anderen Substraten, das Zellwachstum limitieren. Allerdings hatte die Glucosekonzentration keinen Einfluss auf die spezifische Wachstumsrate des Organismus. Dieser blieb bei höheren Glucosekonzentrationen lediglich länger in der exponentiellen Phase. Umfassende Studien zu Glucoseaufnahme und -transport in *S. solfataricus* zeigten, dass der Organismus über einen ABC-Transporter mit einer sehr hohen Affinität zu Glucose verfügt und selbst bei extrem niedrigen Konzentrationen das Substrat effizient nutzen kann (Albers et al., 1999). Diese hohe Affinität spiegelt möglicherweise eine Anpassung an den teilweise nährstoffarmen Lebensraum dieses extremophilen Organismus wieder. Möglicherweise steht die bereits erwähnte kurze Stationärphase bei *S. solfataricus* (**Kap. 4.1.2**) in Zusammenhang mit der verfügbaren Glucose, die solange von den Zellen aufgenommen werden kann, bis sie fast vollständig verbraucht ist und der Organismus auf diese Weise relativ schnell von der Wachstums- in die Absterbephase übergeht.

Wurde mit 8 g/L Glucose im Medium kultiviert, wuchsen die Zellen ebenfalls bis auf eine OD von 2.3 und die Restkonzentration an Glucose betrug 1.9 g/L (Daten nicht gezeigt). In Studien wurde gezeigt, dass eine Glucose-Restkonzentration von 3 g/L optimal für das Wachstum von *S. solfataricus* ist (Kan et al., 1997). Da die Zellen für die Metabolomanalyse immer in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet wurden und bei einer Anfangskonzentration von 4 g/L in diesem Stadium die Glucosekonzentration noch etwa 2 g/L betrug, erwies diese sich demnach als geeignet. Ein wichtiges Kriterium war außerdem, dass die Zellen eine bestimmte Dichte erreichten, um genügend biologisches Material für die Metabolomanalyse gewährleisten zu können. Dies war bei der gewählten Glucosekonzentration in jedem Fall gegeben.

#### 4.1.5 Quantifizierung des assimilierten Kohlenstoffs

Eine Kohlenstoffbilanz beschreibt alle Kohlenstoffströme, die in einem definierten System, wie z.B. einem Bioreaktor, zu- und abfließen. Dabei wird in Form einer Massenbilanz der Kohlenstoff aus den zugefügten Substraten, der Biomasse und allen vom Organismus gebildeten Produkten, darunter das CO<sub>2</sub> in der Abluft und sekretierte C-haltige Verbindungen, erfasst. In diesem Fall ist das einzige C-haltige Substrat Glucose. Zur Sekretion von C-haltigen Verbindungen ist für *S. solfataricus* bisher nichts bekannt. HPLC-

Messungen der Zellüberstände zeigten ebenfalls keine auffälligen Peaks, die auf sekretierte Substanzen hindeuten könnten. Aufgrund von Schwierigkeiten bezüglich der CO<sub>2</sub>-Messung mit der hier verwendeten Apparatur, die mit dem langsamen Wachstum und zu geringen Zelldichten von *S. solfataricus* zusammenhängen, können keine Angaben zum Kohlenstoffanteil in der Abluft getroffen werden. Aus diesem Grund beschränkt sich die Bilanz ausschließlich auf den Kohlenstoff aus der Glucose und der Biotrockenmasse. Würden alle Kohlenstoffflüsse erfasst, müsste die Massenbilanz über die gesamte Kultivierung hinweg unverändert bleiben.

Beim Vergleich der Glucoseabnahme in Korrelation zur Biomasseproduktion pro Zeit bei 80 °C und 70 °C fällt auf, dass die Werte bei beiden Temperaturen proportional zueinander sind, d.h. pro Gramm Biomasse wurde gleichviel Glucose verbraucht, jedoch mit einer zeitlichen Verzögerung von etwa 20 Stunden bei 70 °C (**Kap. 3.1.6, Abb. 16**). Die anschließende Massenbilanz zeigt, dass bei beiden Temperaturen in der exponentiellen Phase ca. 30 % des Kohlenstoffs aus Glucose zur Bildung von Biomasse genutzt wurden. In der Übergangsphase waren es nur noch 18 % (**Abb. 17**). In der exponentiellen Phase ist der Organismus auf Wachstum ausgerichtet, somit ist der Wert erwartungsgemäß höher als in der Übergangs- und Stationärphase, in der das Zellwachstum nach und nach durch verschiedene Faktoren limitiert wird. Meistens findet in der stationären Phase die höchste Produktionsrate statt. Auffällig ist, dass der Anteil des assimilierten Kohlenstoffs insgesamt viel geringer ist als bei anderen Mikroorganismen, wie z.B. *C. glutamicum*. Bei *C. glutamicum* beträgt die C-Ausbeute in der exponentiellen Phase allein für die Biomasse über 50 % (Daten hier nicht gezeigt). Eine Erklärung wäre, dass *S. solfataricus* aufgrund seiner natürlichen Umgebung unter rauen Bedingungen an eine im Vergleich zu anderen Mikroorganismen ineffizientere Lebensweise adaptiert ist, in der er viel mehr Kohlenstoff veratmet als Biomasse produziert, was auch in Relation zur relativ geringen erreichbaren Zelldichte steht. Möglich wäre auch, dass Hyperthermophile viel mehr Energie in die Erhaltung und Reparatur ihrer zellulären Strukturen aufwenden müssen und dadurch eine schlechtere C-Ausbeute haben.

Infolgedessen kann davon ausgegangen werden, dass die restlichen 70 % des Kohlenstoffs zum größten Teil in Form von CO<sub>2</sub> abgegeben wurden. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Organismus kohlenstoffhaltige Verbindungen, wie z.B. organische Säuren, ausschleust. Möglich wäre auch, dass es sich um sehr flüchtige Verbindungen

handelt, die aus diesem Grund analytisch schwer zu erfassen sind. Die in diesem Versuch erhobenen Daten zeigen letztlich, dass bei Temperaturen unterhalb des Optimums keine Unterschiede bezüglich der Glucoseaufnahme und der Verwertung für die Biomasseproduktion bestehen. In einer Studie von Simon et al., 2009 wurde gezeigt, dass *S. solfataricus* bei Variation der zugeführten O<sub>2</sub>-Konzentration starke Unterschiede in der C-Bilanz aufweist. Bei optimalen 21 % O<sub>2</sub> in der Zuluft wurden über 70 % des Kohlenstoffs aus der Glucose für die Biomasseproduktion und den CO<sub>2</sub>-Ausstoß verbraucht. Bei für den Organismus kritischen O<sub>2</sub>-Konzentrationen über 26 %, aber auch bei niedrigeren Werten unter 15 %, betrug der Wert lediglich 35-42 %. Es wird vermutet, dass der Rest des Kohlenstoffs in die Produktion von Sekundärmetaboliten, wie z.B. Exopolysacchariden, investiert wird. Interessant ist jedoch, dass die Wachstumsrate bei unter 15 % wie auch bei 21 % O<sub>2</sub> in etwa gleich ist, aber trotzdem eine weniger effiziente C-Ausbeute bei den niedrigen O<sub>2</sub>-Werten vorliegt. Anders verhält es sich beim Temperaturunterschied in dem hier durchgeführten Versuch, wo eine Verringerung der Wachstumsrate vorliegt. Die C-Ausbeute bei 70 °C scheint trotzdem genauso effizient zu sein wie bei optimalen 80 °C. Wäre der Wert beispielsweise niedriger als bei 80 °C, könnte von einer Einschränkung aufgrund der niedrigen Temperatur ausgegangen werden, z.B. in Form einer ineffizienten Produktion von Nebenprodukten oder einem schlechteren Verhältnis zwischen Wachstum und Atmung.

## 4.2 Methodenetablierung für die Metabolomanalyse

Da mit *S. solfataricus* bislang noch keine Metabolomanalysen durchgeführt wurden, bestand das Ziel zunächst darin, eine effektive Aufarbeitungsmethode für diesen Organismus zu etablieren. Dabei wurde das bereits in der Arbeitsgruppe vorliegende Protokoll für das Bakterium *C. glutamicum* (Strelkov et al., 2004) verwendet und an *S. solfataricus* angepasst. Für eine reproduzierbare und verlässliche Metabolomanalyse ist es von besonderer Wichtigkeit, alle Parameter über die gesamte Prozedur von der Zellernte über Zellaufschluss, Metabolitextraktion, GC-MS-Analyse und Auswertung konstant zu halten, so dass sowohl methodische als auch Messfehler so gering wie möglich ausfallen. Die Zellen wurden für alle Vergleiche während der exponentiellen Wachstumsphase

geerntet und eine konstante Menge an Biotrockenmasse musste für jede Probe gewährleistet sein. Ebenso wichtig für eine reproduzierbare Metabolomanalyse ist das vollständige Abstoppen des Metabolismus (Quenching) zum Erntezeitpunkt. Hierzu wurden mehrere Methoden getestet, die zum Teil für mesophile Mikroorganismen etabliert worden sind (Spura et al., 2009). Ein anderes wichtiges Kriterium ist ein effizienter Zellaufschluss, um so viele Metabolite wie möglich zu extrahieren. Dies war insbesondere im Hinblick auf den unterschiedlichen Aufbau der äußeren Zellhülle und der Biomembran des mesophilen Bakteriums *C. glutamicum* und des hyperthermophilen Archaeons von Bedeutung. Das Ziel der Methodenoptimierung war ein GC-MS-Chromatogramm mit ausreichend hohen Intensitäten der niedrigkonzentrierten Metabolite, gleichzeitig sollte es jedoch nicht zu überladen sein.

### Quenching

Bei den meisten Mikroorganismen, für die bereits Quenchingmethoden existieren, lässt sich der Metabolismus am effektivsten mit sehr kalten organischen Lösungen wie Methanol oder Ethanol abstoppen. Dabei werden Temperaturgradienten von 40 °C bis sogar 70 °C erreicht. Problematisch sind jedoch oft Metabolitverluste aufgrund von Undichtigkeiten in der Zellhülle, die durch den Kälteschock ausgelöst werden (Wittmann et al., 2004). Für den hyperthermophilen Organismus *S. solfataricus* lagen bisweilen keine Untersuchungen dieser Art vor. Vergleichende Metabolomergebnisse des Quenchversuchs mit kaltem Ethanol (-20 °C) und der Standard-Aufarbeitungsmethode bei 4 °C zeigten deutlich, dass diese Quenchingmethode für *S. solfataricus* nicht geeignet ist. Fast alle Metabolite kamen in niedrigeren Konzentrationen vor bzw. wurden in den gequenchten Proben nicht detektiert (**Kap. 3.2.1, Abb. 18**). Allem Anschein nach ist auch hier der Grund ein hoher Metabolitverlust aufgrund von undichten Zellhüllen. Wahrscheinlich ist die enorme Temperaturdifferenz für eine Zelle, die sich bei 80 °C optimal entwickelt, zu groß und die Zellhülle wird bei zu großer Kälte porös. Bei der Analyse der Zellüberstände wurden dementsprechend signifikant mehr Metabolite detektiert als in Überständen ungequenchter Zellen.

Wurden *S. solfataricus*-Zellen mit kaltem Methanol bei -60 °C gequench, waren die Metabolitverluste noch größer (Daten hier nicht gezeigt). Infolge dieser Ergebnisse wurde die kalte Ethanolmethode bei höheren Temperaturen getestet und mit der Standardmethode

nach Strelkov verglichen. Doch auch beim Ethanol-Quenching bei 4 °C und sogar bei Raumtemperatur (20 °C) fiel das Ergebnis ähnlich aus wie bei -20 °C. Die Metabolitverluste waren fast genauso hoch. Eine weitere Erklärung könnte eine starke Empfindlichkeit des Organismus gegenüber Alkohol sein. Interessant ist, dass *S. solfataricus* Ethanol in geringen Konzentrationen als alleinige C- und Energie-Quelle nutzen kann (Chong et al., 2007). Ab einer Konzentration von 3.97 % wirkt Ethanol jedoch wachstumsinhibierend und toxisch. Womöglich lässt eine Konzentration von 40 % die Zellen teilweise lysieren, unabhängig von der Temperatur. Somit erwies sich das Quenching mit alkoholischen Lösungen als ungeeignet für *S. solfataricus*.

Aufgrund der guten Metabolomergebnisse bei der Standardaufarbeitungsmethode nach Strelkov wurde diese weiter optimiert. Dabei musste berücksichtigt werden, dass bei der für mesophile Organismen entwickelten Methode die Temperaturdifferenz zwischen Kulturmedium (ca. 30-37 °C) und Waschlösung bei der Aufarbeitung (4 °C) etwa 30 °C beträgt, bzw. beim Ethanol-Quenching nicht mehr als 60 °C. Für *S. solfataricus* ist die Temperaturspanne bei der 4 °C-Methode bereits 76 °C. Aus diesem Grund erwies es sich als sinnvoll, diese große Differenz zu reduzieren und die Waschprozedur bei Raumtemperatur (20 °C) durchzuführen. Die Temperaturdifferenz betrug dann nur noch 60 °C. Es wurden Metabolomanalysen von Proben durchgeführt, die sowohl bei 4 °C als auch bei 20 °C aufgearbeitet worden waren. Proben, die für jeweils 30 Minuten bei der jeweiligen Temperatur gelagert wurden, sollten das Abstoppen des Metabolismus belegen. Beim Vergleich der Metabolomdaten der 4 °C- und 20 °C-Proben mit den jeweiligen Standproben zeichnen sich einige Unterschiede ab (**Abb. 19** und **20**). Während bei der 4 °C-Methode nach einer halben Stunde Standzeit Veränderungen von Metabolitkonzentrationen zu erkennen waren, fielen bei 20 °C keine Unterschiede auf. Alle detektierten Metabolite wiesen nach einer halben Stunde bei RT die gleiche Konzentration auf, was darauf schließen ließ, dass der Metabolismus bei RT - zumindest die Enzyme, die die hier identifizierten Metabolite umsetzen - vollständig abgestoppt wurde. Da bei 4 °C erwartungsgemäß noch weniger Enzymaktivität vorhanden sein müsste als bei 20 °C, lassen sich die Veränderungen und teilweisen Verluste von Metaboliten womöglich mit dem Kälteschock, ähnlich wie beim Quenching mit kalten alkoholischen Lösungen, erklären. Untersuchungen haben bereits gezeigt, dass *S. solfataricus*-Zellen, im Gegensatz zur Lagerung bei Raumtemperatur, bei vorübergehender Lagerung bei 4 °C irreparabel

geschädigt werden können, (Hjort und Bernander, 1999). Diese Ergebnisse führten im Rahmen dieser Arbeit zur Anpassung der Temperatur während der Waschprozedur bis zur Zelllyse von 4 °C auf 20 °C. Um die Zellen dennoch schnellstmöglich von 80 °C auf 20 °C abzukühlen, wurde dem ersten Zentrifugationsschritt zur Abtrennung der Zellen vom Medium ein einminütiger Kühlungsschritt in Eiswasser vorangestellt. Ohne vorherige Kühlung betrug die Temperatur des Mediums nach 5-minütiger Zentrifugation bei 20 °C noch 57 °C. Bei dieser Temperatur sind jedoch noch sehr viele Enzyme von *S. solfataricus* teilweise oder vollständig aktiv.

### Aufarbeitungsprozedur

Das Entnahmevolumen der Zellen von 20 mg Biotrockenmasse (BTM), welches dem Standardprotokoll für *C. glutamicum* entspricht, erwies sich auch für *S. solfataricus* als gut geeignet für eine aussagekräftige Metabolomanalyse (**Kap. 3.2.2**). Größere Mengen wurden ebenfalls getestet, führten jedoch zu keiner signifikanten Verbesserung des Ergebnisses bzw. mehr detektierbaren Metaboliten. Der Effekt war aufgrund einer Überladung und damit Einschränkung der Quantifizierbarkeit der größten Peaks eher negativ. Zur Gewährleistung der Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit wurde bei jedem einzelnen Experiment konstant die gleiche Menge BTM pro Probe für die Metabolomanalyse eingesetzt. Beim PBL 2025-Stamm und der *knock out* Mutante PBL 2025 $\Delta$ SSO3195 wurde, da es sich um veränderte Stämme von *S. solfataricus* handelt, eine separate Bestimmung der Biotrockenmasse durchgeführt. Das Ergebnis war vergleichbar mit dem des P2-Stammes, somit konnte das Entnahmevolumen für die PBL-Stämme mit dem gleichen Korrelationsfaktor bestimmt werden.

Wie bereits erwähnt, wurden alle Schritte von der Ernte bis kurz vor der Zelllyse bei 20 °C durchgeführt. Dies beinhaltete die Temperatur der Waschlösung sowie die Zentrifugation. Alle weiteren Schritte aus dem Standardprotokoll für *C. glutamicum* konnten beibehalten werden (**Kap. 3.2.2, Abb. 21**). Beim Schritt der Zelllyse, welche bei 70 °C in Methanol im Ultraschall stattfindet, stellte sich erneut die Frage der Temperaturbedingungen. Für mesophile Organismen stellt die hohe Temperatur neben der chemischen (Methanol) und mechanischen (Ultraschall) Komponente eine zusätzliche Hilfe zur Zelllyse dar. *S. solfataricus* ist bei 70 °C noch zu 100 % lebensfähig. Vergleichende Metabolomanalysen zeigten jedoch keinen Unterschied zwischen Zellen, die bei 70 °C und solchen, die bei

Raumtemperatur mit Ultraschall behandelt worden waren. Zusätzlich konnte auf diese Weise sichergestellt werden, dass alle detektierbaren Metabolite während des heißen Lyseschrittes stabil blieben. Chromatogramme mit ausreichend hohen Peakintensitäten reflektierten einen gut funktionierenden Zellaufschluss und ferner eine erfolgreiche Extraktion sowie Derivatisierung der polaren Metabolite.

### **4.3 Metabolomanalyse von *Sulfolobus solfataricus***

Neben zahlreichen Projekten mit unterschiedlichen Themen zum Stoffwechsel von *S. solfataricus* (Nunn et al. 2010; Chong et al. 2006; Snijders et al. 2006) existierten bisweilen keine Daten, welche das Ziel der Erfassung des gesamten Metaboloms dieses Organismus verfolgten. Lediglich für ein anderes hyperthermophiles Archaeon, das Euryarchaeon *Pyrococcus furiosus*, wurde ein systembiologischer Ansatz inklusive Metabolomanalyse ausgearbeitet (Trauger et al., 2008). Somit war das erste Ziel, insbesondere im Hinblick auf die speziellen Fragestellungen im SulfoSys-Projekt - eine qualitative Analyse des metabolischen Profils von *S. solfataricus*. Welche Stoffe lassen sich mittels der optimierten Aufarbeitungsmethode identifizieren und quantifizieren?

Ein weiterer wichtiger Schritt war der qualitative Vergleich der *S. solfataricus*-Daten mit gruppeninternen Metabolomdaten von anderen Mikroorganismen, wie *C. glutamicum*, *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae*. Welche Besonderheiten im Metabolom zeichnen *S. solfataricus* aus und lassen sich interessante Unterschiede zwischen Archaeen, Bakterien und Eukaryoten beobachten? Gibt es spezielle Unterschiede, die auf Hyperthermophilie bzw. Mesophilie zurückzuführen sind?

#### **4.3.1 Charakterisierung des metabolischen Profils von *S. solfataricus***

##### **4.3.1.1 Das GC-MS-Chromatogramm von *S. solfataricus***

Mit der oben beschriebenen Aufarbeitungsmethode ist es gelungen, zuverlässige und vor allem reproduzierbare Metabolomdaten zu generieren. Die Intensitäten der detektierten Metabolite unterschieden sich zum Teil um mehrere Größenordnungen. Einige Peaks mit großer Intensität waren im Chromatogramm (Totalionenstrom) sehr gut sichtbar und

prägten damit das typische chromatographische Profil von *S. solfataricus* (**Kap. 3.3.1, Abb. 22**). Da in der vorliegenden Arbeit keine absoluten Metabolitkonzentrationen bestimmt wurden, wurden die vorhandenen Peakflächen ausschließlich einem relativen Vergleich unterzogen. Dies bezog sich allerdings nur auf den jeweils gleichen Stoff (bzw. gleiches Derivat) in Proben aus unterschiedlichen Versuchen. Die Intensitäten unterschiedlicher Stoffe eines Chromatogramms hängen oftmals von ihrer Derivatisierbarkeit ab und können nicht einfach einem quantitativen Vergleich unterzogen werden. Bei großen Unterschieden zwischen Peakflächen unterschiedlicher Stoffe innerhalb eines Chromatogramms kann jedoch davon ausgegangen werden, dass diese sich in etwa proportional zur Konzentration des Stoffes verhalten.

Auffällig war die sehr hohe Trehalose-Konzentration. Der Trehalose-Peak wies in allen gemessenen Proben die höchste Intensität auf. Für eine verlässliche Quantifizierung dieses Metabolits war es nötig, die Proben vor der Analyse um Faktor 10 zu verdünnen. Trehalose fungiert in *S. solfataricus* als kompatibles Solut und wird in großen Mengen gebildet. Es schützt viele Organismen gegen Stressfaktoren wie Hitze, Trockenheit oder osmotischen Stress. Für *S. solfataricus* ist Trehalose das einzige bisher beschriebene kompatible Solut (Martins et al., 1997).

Glucose war ebenfalls in hohen Konzentrationen im Chromatogramm vorhanden, was bei einer Kultivierung auf Glucose auch zu erwarten ist. Weiterhin wurden Glycerol und Glycerol-3-phosphat stets in hohen Intensitäten identifiziert. Zwar hat Glycerol auch einen biologischen Ursprung und kommt z.B. in der Zellmembran von *S. solfataricus* vor, in diesem Fall jedoch könnte es zusätzlich aus dem Glycerolstock stammen. Auffallend war nämlich, dass Proben aus Kulturen mit Vorkultur einen viel geringeren Glycerol-Peak aufwiesen als Kulturen, welche direkt mit einem Glycerolstock angeimpft wurden. Mögliche Erklärungen wären entweder Restspuren von Glycerol trotz zweimaligen Waschens der Zellen oder die Zellen nahmen es aktiv auf, konnten es jedoch nicht verwerten.

Der Phosphat-Peak war im Vergleich zu anderen Metaboliten ebenfalls sehr groß, konnte jedoch nicht quantifiziert werden, da es sich um Phosphat-Abspaltprodukte von vielen Verbindungen sowie Verunreinigungen handelt. Eine hohe Phosphat-Konzentration im Zellextrakt könnte somit wichtige Anhaltspunkte zum Ausmaß der Dissoziation labiler phosphorylierter Verbindungen geben. Der interne Standard Ribitol diente der späteren



Normierung aller Peakflächen und war ebenfalls im TIC zu sehen. Die Konzentration wurde so gewählt, dass die Peakfläche in etwa eine mittlere Größe einnimmt. Der Metabolit Spermidin sowie ein unbekannter, jedoch reproduzierbarer Peak (Unknown-P2-113) (siehe **Kap. 3.3.6**), der möglicherweise ebenfalls einer polyaminen Verbindung entspricht, kamen ebenfalls in vergleichsweise hohen Konzentrationen vor. Polyamine werden in hyperthermophilen Organismen häufig beschrieben, da sie der Zelle mit vielfältigen Funktionen, insbesondere auch dem Schutz vor Hitze, dienen. Spermidin ist in den meisten dieser Organismen – darunter auch *S. solfataricus* – am stärksten vertreten (Friedman und Oshima, 1989).

#### 4.3.1.2 Vergleich mit anderen Mikroorganismen

Aufgrund zu großer Diskrepanz bezüglich der Morphologie der unterschiedlichen Organismen ist es nicht möglich, einen direkten Vergleich der Metabolitkonzentrationen durchzuführen. Hier sollen deswegen lediglich grobe Unterschiede zwischen *S. solfataricus* und anderen Organismen diskutiert werden. Alle Organismen, die hier in den Vergleich miteinbezogen wurden – darunter *C. glutamicum*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. cerevisiae*, *E. coli* und *Thermus thermophilus* - wurden auch in Minimalmedien mit Glucose als einziger C- und Energiequelle unter den jeweiligen Optimalbedingungen kultiviert. Die Ergebnisse stammen zum Teil aus eigenen Versuchen (*C. glutamicum* und *E. coli*) bzw. wurden von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt (*P. putida*, *P. aeruginosa*, *S. cerevisiae*, *T. thermophilus*).

#### Entner-Doudoroff-Weg

Erwartungsgemäß wiesen im *S. solfataricus*-Extrakt einige Metabolite des Zentralstoffwechsels auf die Präsenz des Entner-Doudoroff-Weges hin. Die spezifischen Intermediate des nicht-phosphorylierenden ED-Weges wie Gluconat, KDG, Glyceraldehyd und Glycerat konnten identifiziert werden. Sie kamen wie erwartet in Zellextrakten von Organismen, die keinen ED-Weg besitzen, wie z. B. *S. cerevisiae* und *C. glutamicum*, nicht vor. Die Intermediate KDG und Glyceraldehyd konnten jedoch in Organismen mit dem klassischen ED-Weg, wie *P. putida* und *E. coli*, identifiziert werden. Im klassischen ED-Weg werden allerdings nur die phosphorylierten Formen KDPG und Glyceraldehyd-3-phosphat gebildet. Das Auftauchen der nicht-phosphorylierten Verbindungen in diesen Organismen

deutet darauf hin, dass diese Stoffe im Laufe der Prozedur für die Metabolomanalyse ihre Phosphatgruppe verlieren. Dies könnte auch eine Erklärung dafür sein, dass Intermediate des semi-phosphorylierenden ED-Weges in *S. solfataricus* nicht identifiziert werden konnten. Das Fehlen vieler Metabolite mit Phosphatgruppen war bei *S. solfataricus* am stärksten ausgeprägt. Dieses Phänomen hat möglicherweise etwas mit der hohen Temperatur zu tun. Verbindungen wie KDPG, Glyceraldehyd-3-phosphat (GAP), 3-Phosphoglycerat, 2-Phosphoglycerat und Phosphoenolpyruvat (PEP) haben bei 80 °C eine viel geringere Stabilität als bei Raumtemperatur. Studien haben gezeigt, dass Phosphoenolpyruvat bei 80 °C nach 30 min zur Hälfte dissoziiert ist (Haferkamp, unveröffentlicht). Weitere Untersuchungen mit NMR-Spektroskopie führten zu dem gleichen Resultat und zu der Beobachtung, dass PEP in Pyruvat und Phosphat zerfällt (Daten hier nicht gezeigt). Ein ähnliches Resultat konnte für GAP gezeigt werden, welches jedoch bereits nach 1 min bei 80 °C nicht mehr nachweisbar ist (Haferkamp, eigene Daten, unveröffentlicht). Es besteht die Annahme, dass diese Stoffe in hyperthermophilen Organismen zu Nebenprodukten zerfallen, die wieder in den Stoffwechselweg eingespeist werden können. Das Vorkommen einer größeren Anzahl an phosphorylierten Verbindungen in Zellextrakten von Mesophilen - ausgenommen KDPG und GAP - schließt einen Zerfall während der gesamten Aufarbeitungs- und Analyseprozedur aus.

Ein anderer möglicher Grund könnten zu schnelle Umsetzungsraten und damit zu niedrige Konzentrationen dieser Metabolite in der Zelle sein. Die meisten Reaktionen laufen *in vivo* sehr schnell ab. *Substrate Channeling* ist in Hyperthermophilen weiter verbreitet als in Mesophilen. Reaktionsprodukte werden dabei so gut wie gar nicht ins Cytosol entlassen, sondern binden direkt an das aktive Zentrum des nächsten Enzyms einer Reaktionskette. Durch diesen Mechanismus wird die Konzentration hitzeinstabiler Verbindungen im Cytosol gering gehalten und die Metabolite dadurch geschützt. Interessant ist jedoch die Tatsache, dass auch das bei 70 °C kultivierbare Bakterium *T. thermophilus* mehr phosphorylierte Metabolite aufwies als *S. solfataricus*. Der Grund dafür kann nicht beim Temperaturunterschied von 10 °C liegen, denn auch bei *S. solfataricus*-Kultivierungen bei 70 °C und 65 °C konnten diese Metabolite nicht detektiert werden. Es könnte sich also bei *S. solfataricus* tatsächlich um eine organismenspezifische Anpassungsstrategie handeln. Das Vorkommen von Ribulose-5-phosphat und der unphosphorylierten Ribose in *T. thermophilus* weist auf einen stärkeren Fluss durch den Pentosephosphatweg (PPP) im

Vergleich zu *S. solfataricus* hin. Bakterien sind auf den PPP weitaus stärker angewiesen als *S. solfataricus*, da es neben dem Zitronensäurezyklus für sie der einzige Weg ist, um das Reduktionsäquivalent NADPH zu generieren, während *S. solfataricus* es an mehreren Stellen im verzweigten ED-Weg bildet (siehe **Kap. 1.1.3, Abb. 4**).

Andere phosphorylierte Verbindungen, wie z.B. Glucose-6-phosphat und Fructose-6-phosphat, scheinen robuster gegenüber der Aufarbeitungsprozedur bzw. hohen Temperaturen zu sein und lagen dementsprechend in viel höheren Konzentrationen in der Zelle als andere phosphorylierte Verbindungen. Sie konnten in allen untersuchten Organismen identifiziert werden. Beide Faktoren, sowohl die Konzentration im Cytosol als auch Stabilität bzw. Messbarkeit spielen bei der Detektion vermutlich eine gleich große Rolle.

### **Nicht-phosphorylierte Verbindungen**

*S. solfataricus* wies auffallend hohe Konzentrationen an nicht phosphorylierten Verbindungen wie Xylulose und Glucosamin auf, die in den anderen Organismen auch in der phosphorylierten Form vorkamen. Unklar ist, ob es sich dabei auch um ein Phänomen von Instabilität handelt oder ob diese Metabolite für andere wichtige Funktionen im Stoffwechsel synthetisiert werden. Denn auch Fructose wurde in höheren Konzentrationen in *S. solfataricus* detektiert, obwohl diese auch in phosphorylierter Form vorhanden war. In jedem Fall könnte es sich ebenfalls um eine Eigenschaft handeln, die speziell auf die Hyperthermophilie oder auf den Stamm der Archaeen zurückzuführen ist. Lediglich Glucosamin könnte einer organismenspezifischen Eigenschaft zugeordnet werden. Es ist bekannt, dass *S. solfataricus*, wie zahlreiche andere Mikroorganismen auch, Exopolysaccharide (EPS) an seiner Zelloberfläche ausbildet. Besonders für extremophile Organismen stellen Exopolysaccharide einen gemeinsamen Schutzmechanismus dar (Nicolaus et al., 2010). Die EPS von *S. solfataricus* bestehen hauptsächlich aus Glucose, Mannose, Galactose und Glucosamin (Nicolaus et al., 1993). Damit ließe sich der Nachweis dieser Zucker im Zellextrakt unter anderem erklären. Wahrscheinlich lassen sich mit der Synthese von Galactose alle weiteren Galactosederivate, wie Galacturonat und Galactosamin, die ebenfalls ausschließlich in *S. solfataricus* detektiert wurden, erklären. Studien haben außerdem gezeigt, dass die EPS verstärkt in der stationären Phase gebildet werden (Nicolaus et al., 1993). Bei Metabolomvergleichen zwischen exponentieller und stationärer Wachstumsphase konnten tatsächlich höhere Konzentrationen mehrerer der

betreffenden Kohlenhydrate sowie ihrer Derivate in der stationären Phase nachgewiesen werden (Mönch-Tegeder, unveröffentlicht).

### Aminosäuren

Insgesamt waren viele der in allen Organismen detektierten Metabolite, insbesondere Aminosäuren und Intermediate des Zitronensäurezyklus, in Bakterien wie *E. coli* und *C. glutamicum* in viel höheren Konzentrationen vorhanden als in *S. solfataricus*, was bei *C. glutamicum* noch stärker ausgeprägt war als bei *E. coli*. *C. glutamicum* ist für seine Fähigkeit, in hohem Maße Aminosäuren zu produzieren, bekannt. Auch das thermophile Bakterium *T. thermophilus* wies vergleichsweise niedrige Konzentrationen dieser Metabolite auf. Zwar haben Organismen wie *C. glutamicum*, *E. coli* und *P. putida* viel höhere Wachstumsraten als *S. solfataricus*, was eine Erklärung für den höheren Umsatz dieser Metabolite sein könnte. *T. thermophilus* ist jedoch mit seiner Wachstumsrate nur minimal langsamer als *C. glutamicum*, *E. coli* und *P. putida*. Somit könnten die niedrigen Konzentrationen durchaus mit der Hochtemperatur zusammenhängen.

Doch auch *S. solfataricus* wies Metabolite auf, welche die jeweiligen Mengen in den anderen Organismen stark überstiegen. So war zum Beispiel die Trehalose-Konzentration, die in allen hier untersuchten Organismen vorkam, in *S. solfataricus* am größten, gefolgt von *C. glutamicum*, während *E. coli* nur sehr niedrige Konzentrationen aufwies. Dieses Ergebnis stimmt mit der Literatur überein, in der Trehalose auch für *C. glutamicum* als Speicherstoff und Stressmetabolit beschrieben wird.

### Zuckeralkohole

Einige weitere Metabolite konnten in größeren Mengen bzw. ausschließlich im *S. solfataricus*-Extrakt identifiziert werden und spiegeln damit sehr wahrscheinlich archaeen- bzw. hyperthermophilen-spezifische Eigenschaften wieder. So z.B. einige Zuckeralkohole wie Inositol, Erythritol und Mannitol. Mannitol ist im GC-MS-Chromatogramm kaum von Sorbitol zu unterscheiden, weshalb nicht sicher gesagt werden kann, um welche der beiden Verbindungen es sich handelt. Auch eine unbekannte, jedoch reproduzierbare Verbindung (Unknown-P2-002), weist auf diese Stoffklasse hin (siehe **Kap 3.3.6**). Diese sog. Polyole wurden bereits zahlreich als Osmoprotektanten in

Mikroorganismen und höheren Pflanzen beschrieben, fungieren aber auch als Schutzstoffe gegenüber anderen Stressoren wie Temperatur oder Trockenheit (Costa et al., 1998). Inositol kam in *S. solfataricus* in hohen Konzentrationen vor. Dieser Metabolit kann unterschiedliche Funktionen in der Zelle ausüben (Roberts, 2006). In Eukaryoten übernimmt er Aufgaben in der Signalübertragung. In Bakterien und Archaeen kann Inositol gelöst, z.B. als kompatibles Solut, vorkommen. Das hyperthermophile Archaeon *P. furiosus* akkumuliert große Mengen des kompatiblen Soluts Di-myo-Inositol-phosphat als Osmoprotektant, aber auch bei Temperaturstress (Chen et al., 1998). Andererseits fungiert Inositol auch als Bestandteil von Biomembranen. Dies wurde auch für *S. solfataricus* beschrieben (Langworthy et al. 1974). Wahrscheinlich lässt sich die hohe Konzentration mit der damit verbundenen Synthese erklären.

Auch Erythritol wurde in größeren Mengen im *S. solfataricus*-Extrakt gefunden. Bisher konnte kein Stoffwechselweg für diese Verbindung ausgemacht werden, doch es könnte sich um ein Nebenprodukt des aus dem Pentosephosphatweg stammenden Erythrose-4-phosphat handeln. Es wäre möglich, dass der Organismus auf diese Weise eine energetisch günstige Verbindung zum Schutz vor Temperaturstress synthetisiert. Dasselbe könnte für die weiteren detektierten Zuckeralkohole gelten. Eine andere Annahme wäre aber, dass diese Verbindungen Nebenprodukte eines stark ausgeprägten Kohlenhydrat-Umsatzes bei Wachstum auf Glucose als einziger C-Quelle sind. Zuckeralkohole kommen z.B. bei Umsetzungen von Pentosen und Glucuronat, Glycogenmetabolismus oder auch Fructose- und Mannose-Umsetzungen vor. Sorbitol wird beispielsweise direkt aus Glucose oder Fructose gebildet. An dieser Stelle wäre ein Vergleich mit Kulturen sinnvoll, die auf einer nicht kohlenhydrat-haltigen C-Quelle kultiviert worden sind. Inositol und Erythritol wurden in mesophilen Bakterien nicht detektiert, kommen aber auch in *S. cerevisiae* vor. Da Archaeen einige Gemeinsamkeiten mit Eukaryoten haben, könnte es sich hierbei ebenfalls um eine archaeen- bzw. eukaryotenspezifische Eigenschaft handeln.

Vergleicht man die beiden thermophilen Organismen *S. solfataricus* und *T. thermophilus*, fällt auf, dass beide Organismen im Vergleich zu den Mesophilen hohe Konzentrationen an Kohlenhydraten aufweisen. Neben hohen Konzentrationen an Monosacchariden wie Glucose und Fructose kamen auch gehäuft Disaccharide wie Cellobiose, Maltotriose, Palatinose und Lactose vor, die zum Teil in den mesophilen Organismen nicht detektiert wurden.

Auffällig waren außerdem die hohen Konzentrationen aminhaltiger Verbindungen, die das metabolische Profil von *S. solfataricus* prägten. Spermidin war einer der höchsten Peaks im Chromatogramm und wurde ebenfalls nur in *S. cerevisiae* gefunden. Putrescin war zwar in *S. solfataricus* viel höher konzentriert als in *C. glutamicum*, die Konzentration dieser Verbindung in *E. coli* war jedoch auffällig hoch. Für Bakterien wurden Polyamine in zahlreichen Studien als Stoffklasse mit sehr vielfältigen Funktionen in der Zelle beschrieben (Raina und Cohen, 1966, Wortham et al., 2007). Sie spielen beispielsweise eine wichtige Rolle bei der Transkription, indem sie die RNA-Polymerase stimulieren. Aber auch in hyperthermophilen Archaeen sind Polyamine unentbehrliche Verbindungen zur Stabilisierung und zum Schutz von Makromolekülen (Higashibata et al. 2000, Oshima et al., 2011). 5'-Methylthioadenosin kam im Vergleich zu den anderen Organismen ebenfalls in *S. solfataricus* in der höchsten Konzentration vor. Dieser Metabolit spielt eine wichtige Rolle in der Polyaminbiosynthese. Er wird bei der Umsetzung von S-Adenosylmethioninamin und Putrescin zu Spermidin gebildet und wird in *S. solfataricus* stark angehäuft (Cacciapuoti et al., 1994). Neben den weit verbreiteten Polyaminen Spermidin und Putrescin bildet *S. solfataricus* längerkettige Formen, das sog. Norspermin (Thermin) und Norspermidin (Caldin). Ihre Präsenz kann womöglich durch zwei der reproduzierbaren unbekannten Verbindungen bestätigt werden (**Kap. 3.3.6**).

Weitere auffällige Metabolite in *S. solfataricus* waren 2-Hydroxyglutarat und 4-Hydroxyphenylacetat. 2-Hydroxyglutarat, das neben *S. solfataricus* auch in *P. aeruginosa* detektiert wurde, ist ein Intermediat des Glutamatabbaus über den Butyratweg und wird direkt aus 2-Ketoglutarat synthetisiert. Da 2-Ketoglutarat in *S. solfataricus* nicht detektiert werden konnte, wäre es möglich, dass der Fluss in den Butyratstoffwechsel stark ausgeprägt ist. Verwunderlich ist jedoch, dass in der Regel Anaerobier diesen Abbauweg für Glutamat nutzen.

4-Hydroxyphenylacetat wurde ausschließlich in *S. solfataricus* identifiziert. Es ist ein Intermediat des Metabolismus aromatischer Aminosäuren. Allerdings ist auch dieser Metabolit die einzige Verbindung aus den entsprechenden Wegen, somit können keine Zusammenhänge ermittelt werden.

Interessant war außerdem die Präsenz von Homoserin-lacton in *S. solfataricus*. Diese Verbindung spielt in mesophilen Bakterien, wie z.B. in dem pathogenen *P. aeruginosa*, eine Rolle bei der Zell-Zell-Kommunikation, dem sog. *Quorum sensing*. Für hyper-

thermophile Archaeen ist eine solche Fähigkeit bisher nicht bekannt. Allerdings konnte für das haloalkalophile Archaeon *Natronococcus occultus* (Paggi et al., 2003) sowie für das hyperthermophile Bakterium *Thermotoga maritima* (Johnson et al., 2005) ähnliche Signalübertragungen nachgewiesen werden. Unklar ist, was für Funktionen Homoserinlacton in *S. solfataricus* haben könnte. Man weiß lediglich, dass der Organismus Enzyme besitzt, sog. Lactonasen, die diese Verbindungen spalten können (Ng et al., 2011).

Abschließend kann gesagt werden, dass die Metabolomanalyse dieses hyperthermophilen Archaeons deutliche Differenzen zu den hier in den Vergleich miteinbezogenen Organismen aufweist. Wie man sehen konnte, treten neben einigen Parallelen zu mesophilen Bakterien, aber auch einigen Gemeinsamkeiten mit dem Eukaryoten *S. cerevisiae* sowie auch Gemeinsamkeiten mit dem thermophilen Bakterium *T. thermophilus*, auch archaeenspezifische Merkmale auf.

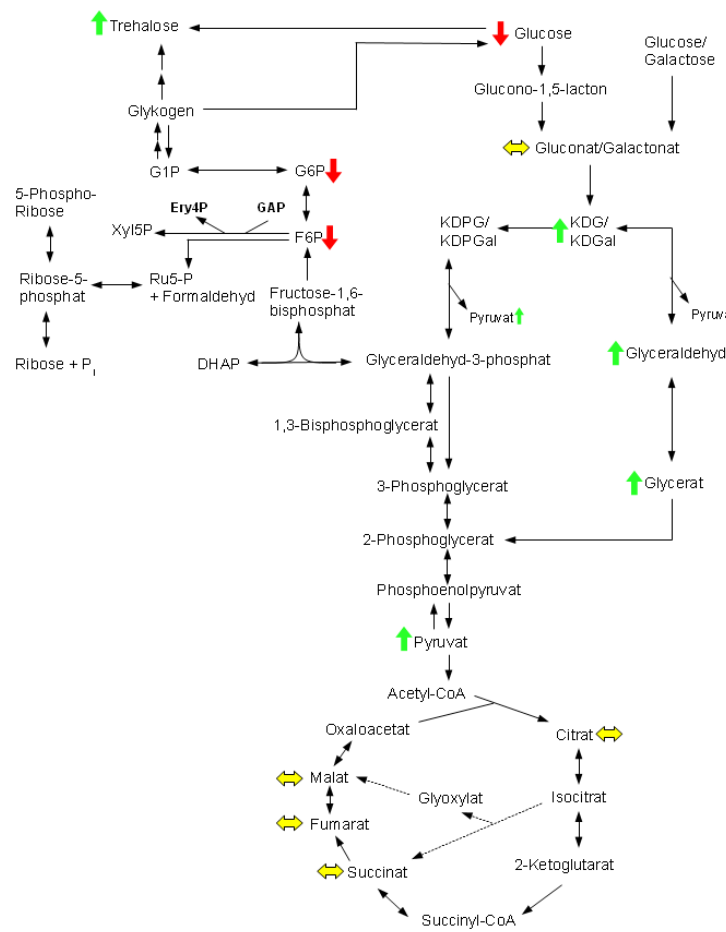
#### 4.3.2 Untersuchungen des Metaboloms bei Temperaturvariationen

Nachdem eine erste Charakterisierung des metabolischen Profils vorgenommen worden ist, wurde nach Änderungen bzw. Anpassungsstrategien von *S. solfataricus* gesucht, wenn dieser unterhalb seiner optimalen Umgebungstemperatur wächst. Mittels Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass der Organismus sich auch bei niedrigeren Temperaturen vermehren kann. Im Rahmen des SulfoSys-Projekts wurden 70 °C und 65 °C als Temperaturen für den Vergleich ausgewählt. Voraussetzung für einen sinnvollen Vergleich waren gleiche Kultivierungs- und Aufarbeitungsbedingungen für alle 3 Temperaturen. Aufgetragen mittels einer PCA ließ sich eine deutliche Separierung der einzelnen Proben in die jeweiligen Kultivierungstemperaturen erkennen (**Kap. 3.3.2, Abb. 23**). Mit 49 % Gesamtvarianz der beiden ersten und 60 % der ersten 3 Hauptkomponenten bestanden einige deutliche Unterschiede im Metabolom. Auffallend war die etwas größere Distanz zwischen 80 °C und der beiden niedrigeren Temperaturen. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass die Veränderungen im Stoffwechsel bei den niedrigeren Temperaturen ähnlicher zueinander sind und die Differenz zwischen 80 °C und 70 °C bzw. 65 °C größer ist, als zwischen den beiden niedrigen Temperaturen selbst. Eine genauere Analyse der Metaboliteinflüsse auf die Vektoren ergab, dass Xylulose, 1,3-Diaminopropan, Lactose, 4-Hydroxyphenylacetat und Glucosamin den stärksten Einfluss auf die Trennung

der einzelnen Zustände hatten.

#### 4.3.2.1 70 °C verglichen mit 80 °C

Bei genauerer Untersuchung der identifizierten Metabolite des zentralen Kohlenhydratstoffwechsels fiel auf, dass die Intermediate des nicht-phosphorylierenden ED-Weges bei 70 °C in höheren Konzentrationen vorlagen als bei 80 °C (**Abb. 43**).



**Abb. 43** (wie 24) Schematische Darstellung des verzweigten Entner-Doudoroff-Weges (ED), des Zitronensäurezyklus, der Gluconeogenese und des Pentosephosphatweges (PPP) bei *S. solfataricus*. Dargestellt wird der Vergleich zwischen 70 °C und 80 °C. Identifizierte Metabolite werden durch farbige Pfeile symbolisiert. Sie sind bei 70 °C signifikant erhöht (grün), signifikant erniedrigt (rot) oder weisen keinen signifikanten Unterschied auf (gelb). Metabolite ohne Pfeil wurden nicht detektiert.



Eine mögliche Erklärung könnte eine Herabsetzung der Aktivität der betreffenden Enzyme aufgrund der niedrigeren Temperatur sein. Werden Substrate nicht schnell genug umgesetzt, kommt es zur Akkumulation. KDG war bei 70 °C im Vergleich zu 80 °C mit einem Faktor von 4.9 stark erhöht. Bei der Umsetzung von KDG spielen im verzweigten ED-Weg in *S. solfataricus* zwei Enzyme, die KD(P)G-Aldolase und die KDG-Kinase, eine Rolle. Die KDG-Kinase hat ihre optimale Aktivität zwischen 70 °C und 80 °C (Kim und Lee, 2006), was auf keine starke Verminderung der Aktivität bei 70 °C schließen lässt. Die KD(P)G-Aldolase dagegen ist extrem hitzestabil, besitzt bei 70 °C allerdings nur noch etwa die Hälfte ihrer ursprünglichen Aktivität (Buchanan et al., 1999). Damit könnte die starke Akkumulation von KDG erklärt werden. Da die KD(P)G-Aldolase aber gleichzeitig auch im semi-phosphorylierenden ED-Weg aktiv ist, würde das bedeuten, dass auch dieser Fluss vermindert ist und zumindest KDPG akkumuliert wird. Da KDPG mit der GC-MS nicht detektiert werden konnte, kann keine Aussage über mögliche Änderungen der Konzentration gemacht werden. Möglich wäre auch der bereits erwähnte Verlust der Phosphatgruppe während der Aufarbeitungsprozedur und damit eine nicht realisierbare Unterscheidung von KDPG und KDG. Eine weitere Annahme, insbesondere hinsichtlich der ebenfalls erhöhten Konzentrationen von Glyceraldehyd und Glycerat wäre, dass lediglich ein Enzym für die Akkumulation der Reaktionskette im nicht-phosphorylierenden ED-Weg verantwortlich ist, nämlich die Glyceratkinase. Sie ist das letzte Enzym im nicht-phosphorylierenden ED-Weg und schließt mit der irreversiblen Phosphorylierung von Glycerat die Verzweigung des ED-Weges. Da alle davorgeschalteten Reaktionen bis zum KDG reversibel ablaufen, wäre es möglich, dass bei einer verminderten Aktivität der Glyceratkinase neben Glycerat auch Glyceraldehyd und KDG akkumulieren. In der Literatur konnten keine Angaben zur Aktivität der Glyceratkinase in Abhängigkeit von der Temperatur gefunden werden.

Interessanterweise wurde in den Transkriptomdaten eine zweifache Hochregulierung der Gluconatdehydratase bei 70 °C festgestellt (Zaparty et al., 2009). Gleiches konnte im Proteom nach dem Kälteschock beobachtet werden (siehe **Kap. 4.3.3**). Das würde die erhöhte KDG-Konzentration bei Temperaturen unter dem Optimum ebenfalls erklären. Einen Beleg dafür, welcher bzw. ob einer der beiden ED-Wege in katabolischer Richtung aktiv stärker genutzt wird, ist damit nicht gegeben. In Vorversuchen wurde jedoch gezeigt, dass das Enzym GAPN, welches die irreversible Reaktion von GAP zu 3-Phosphoglycerat

im semi-phosphorylierenden ED-Weg katalysiert, bei 70 °C hochreguliert ist. Dies wurde sowohl im Transkriptom als auch im Proteom beobachtet (Zaparty et al., 2009). Da, wie bereits beschrieben, im Metabolom keines der Intermediate des semi-phosphorylierenden ED-Weges identifiziert werden konnte, lässt sich keine Aussage darüber machen, ob evtl. ein verstärkter oder geringerer Fluss durch diesen Weg besteht.

Die Vermutung eines insgesamt verringerten Flusses durch den semi-phosphorylierenden und eines verstärkten Flusses durch den nicht-phosphorylierenden ED-Weg wird jedoch durch Metabolomdaten der *knock out* Mutante PBL 2025ΔSSO3195 weiter bekräftigt, wo der Ausfall der KDG-Kinase ebenfalls zu erhöhten Konzentrationen der Intermediate des nicht-phosphorylierenden ED-Weges führte (siehe **Kap. 3.3.5** und **4.3.5**). In diesem Fall ist klar, dass ein Fluss durch den semi-phosphorylierenden Weg nicht möglich ist und folglich der Fluss durch den nicht-phosphorylierenden Weg erhöht wird. Auch bei 70 °C könnte aufgrund einer Verminderung des Flusses durch den semi-phosphorylierenden Weg der Fluss durch den anderen Weg verstärkt werden. Dies könnte auch das Verhalten von Pyruvat erklären, das ausschließlich bei 70 °C detektiert werden konnte. Wahrscheinlich stammt die höhere Konzentration aus der vermehrten Bildung im nicht-phosphorylierenden ED-Weg, in dem Pyruvat bei der Umsetzung von KDG zu Glyceraldehyd gebildet wird. Gleichzeitig könnte es natürlich auch bei der entsprechenden Umsetzung der KD(P)G-Aldolase im semi-phosphorylierenden ED-Weg vermehrt synthetisiert werden. Da Pyruvat jedoch im Mutanten-Vergleich ebenfalls lediglich in der Mutante nachgewiesen wurde, liegt die Vermutung nahe, dass es im nicht-phosphorylierenden Weg angehäuft wird. Es ist anzunehmen, dass der Metabolit bei Optimalbedingungen zu schnell verstoffwechselt wird und somit in zu niedrigen Konzentrationen im Cytosol vorkommt und bei 80 °C nicht detektierbar ist.

Ein weiterer Beleg für einen herunterregulierten semi-phosphorylierenden ED-Weg bei 70 °C könnten die erniedrigten Konzentrationen von Glucose-6-phosphat und Fructose-6-phosphat sein (**Abb. 43**). Es sind die einzigen identifizierten Metabolite des entgegengesetzten Weges - der Gluconeogenese. Auch in der Mutante kamen diese beiden Verbindungen in niedrigeren Konzentrationen vor (**Kap. 3.3.5**). Da in der Mutante, wie bereits erwähnt, kein Durchfluss durch den semi-phosphorylierenden ED-Weg in katabolischer Richtung möglich ist, besteht die Annahme, dass dadurch auch der Fluss in der Gluconeogenese erniedrigt ist. In *S. solfataricus* verläuft der kürzeste Weg von Glucose

zu Fructose-6-phosphat normalerweise über die Spaltung von KDPG zu GAP, welches dann über die Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase direkt in die Gluconeogenese überführt werden kann. Im Fall eines ausgeschalteten semi-phosphorylierenden ED-Weges kann dies nur noch über den nicht-phosphorylierenden Weg erfolgen, was jedoch mehr Energie kostet. Während bei der ersten Variante die Synthese von KDPG ein ATP kostet, werden beim Umweg über den nicht-phosphorylierenden Weg bei zwei Reaktionen ATP verbraucht. Zudem besteht die Vermutung, dass der Organismus auf anabolischem Weg zusätzlich Energie aufgrund des hitzelabilen 1,3-Bisphosphoglycerats verlieren könnte (siehe **Kap. 1.1.3, Abb. 4**).

Gleiches könnte für den Wildtyp bei 70 °C im Falle eines verringerten Flusses durch den semi-phosphorylierenden ED-Weg zutreffen. Es könnte also sein, dass der Organismus bei einer Temperatur von 10 °C unterhalb des Optimums Energie einspart und somit die Gluconeogenese herunterreguliert. Es ist allerdings verwunderlich, dass die Konzentration verschiedener Mono- sowie Disaccharide, wie Lactose, Fructose und Xylulose, bei 70 °C zum Teil stark erhöht war, während sich dies in der Mutante gegensätzlich verhielt (**Kap. 3.3.5.2, Abb. 37**). Demnach könnten herunterregulierte Fructose-6-phosphat- und Glucose-6-phosphat-Konzentrationen mit einem stärkeren Umsatz aufgrund erhöhter Kohlenhydratsynthesen erklärt werden. Die erhöhten Konzentrationen von Sacchariden könnten ebenfalls auf eine gleichbleibende Synthese, jedoch geringeren Verbrauch bzw. Abbau bei der niedrigeren Temperatur hindeuten.

Ein anderer möglicher Grund für die erniedrigte Konzentration von Glucose-6-phosphat und Fructose-6-phosphat könnte ein verstärkter Fluss durch den Pentosephosphatweg sein. Dies konnte nicht weiter überprüft werden, da bei diesem Vergleich keine Verbindung aus dem PPP detektiert werden konnte. Im Mutanten-Vergleich sowie im Kälteschock-experiment (**Kap. 3.3.3**) spricht jedoch eine verringerte Konzentration von Xylulose-5-phosphat in der Mutante bzw. nach dem Kälteschock gegen diese Hypothese.

Hervorstechend ist weiterhin eine signifikant herunterregulierte Glucosekonzentration bei 70 °C. Nach den Ergebnissen des Glucoseverbrauchs bei 70 °C und 80 °C (**Kap. 3.1.6, Abb. 16**) wird pro erreichter Biomasse gleichviel Glucose in die Zellen aufgenommen. Somit kann die erniedrigte intrazelluläre Konzentration nicht an einer Verzögerung des Transports liegen, so dass die Ursache vermutlich im Stoffwechsel zu suchen ist. Gluconat, das im oberen, nicht-verzweigten ED-Weg aus Glucose gebildet wird, zeigte mit einem

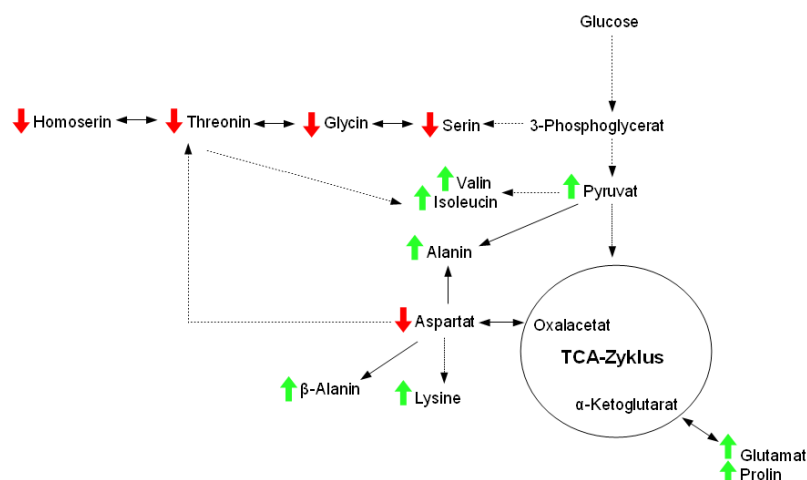
Faktor von 1.43 eine tendenziell erhöhte Konzentration. Es wäre demnach möglich, dass Glucose bei 70 °C schneller in den Stoffwechselweg eingespeist und umgesetzt wurde.

Interessanterweise war der Speicherstoff Trehalose bei 70 °C leicht erhöht. Trehalose fungiert in *S. solfataricus* als kompatibles Solut bei Temperaturstress. Somit wäre es möglich, dass der Organismus den Stoff bei Kälte vermehrt synthetisiert. Diese Hypothese wird außerdem durch die Beobachtung gestützt, dass die Trehalosekonzentration nach einem Hitzeschock herunterreguliert vorlag (siehe **Kap. 3.3.4**). Da Trehalose in *S. solfataricus* unter anderem aus freier Glucose synthetisiert wird, bekräftigt dies die erniedrigte Glucosekonzentration bei 70 °C.

Die Metabolite des Zitronensäurezyklus wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen 70 °C und 80 °C auf. Als ein zentraler Punkt für katabolische und anabolische Reaktionen sowie zur Energiegewinnung weisen unveränderte Konzentrationen im Zitronensäurezyklus trotz langsameren Wachstums des Organismus auf eine insgesamt gute Energiebilanz hin.

Auffällig ist, dass fast alle der detektierten Aminosäuren bei 70 °C in höheren Konzentrationen vorkamen. Diese Beobachtung konnte auch durch Transkriptom- und Proteom-Untersuchungen bestätigt werden (Zaparty et al., 2009). Einige Gene, die für Proteine der Aminosäuresynthese codieren, waren bei der niedrigeren Temperatur hochreguliert. Studien mit dem hyperthermophilen Archaeon *P. furiosus* haben außerdem gezeigt, dass auch in diesem Organismus entsprechende Gene, die für die Synthese von Aminosäuren codieren, bei Temperaturen unterhalb des Optimums und nach einem Kälteschock hochreguliert waren (Weinberg et al., 2005). Es wird vermutet, dass hyperthermophile Organismen „kälte-spezifische“ Proteine bilden, die sich besonders in der Biomembran als Glycoproteine wiederfinden. Eine andere Theorie wäre, dass die Zellen bei niedrigeren Temperaturen und langsamerem Wachstum zwar weiterhin Aminosäuren bilden, sie aber nicht mehr effizient für die Proteinbiosynthese nutzen, da dies ein höherer Energieaufwand für die Zelle ist. Auffällig bei *S. solfataricus* ist, dass die Aminosäuren, welche aus der Vorstufe 3-Phosphoglycerat gebildet werden, niedrigere Konzentrationen aufwiesen, während alle anderen identifizierten Aminosäuren, wie z.B. Glutamat, Lysin oder Valin, hochreguliert waren (**Abb. 26** bzw. **44**). Falls wie vermutet der semi-phosphorylierende ED-Weg bei 70 °C tatsächlich einen geringeren Durchfluss hat und dadurch weniger 3-Phosphoglycerat gebildet wird, könnte dies ein Grund für eine

erniedrigte Produktion der betreffenden Aminosäuren sein.

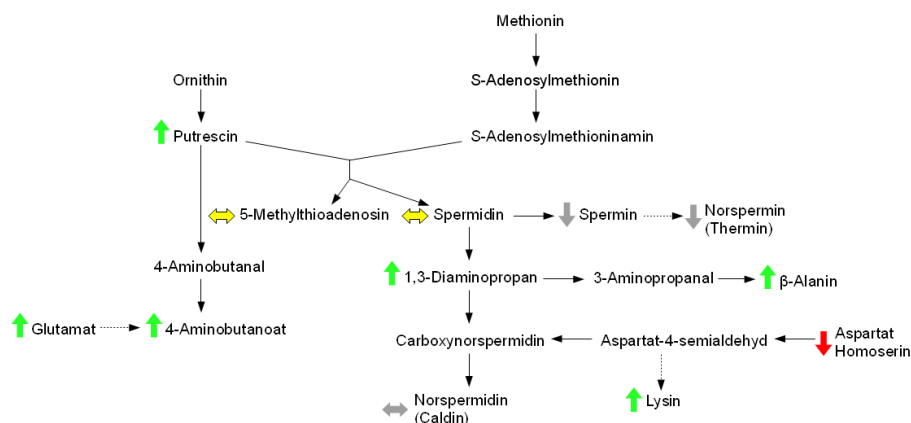


**Abb. 44 (wie 26)** Übersicht über die Hauptbiosynthesewege von identifizierten Aminosäuren. Durchgängige Linien stellen Direktreaktionen zwischen zwei Metaboliten dar, während gestrichelte Linien Zwischenreaktionen beinhalten. Grüne Pfeile symbolisieren signifikant hochregulierte, rote Pfeile signifikant herunterregulierte Stoffe.

1,3-Diaminopropan wurde ausschließlich in 70 °C-Proben detektiert. Dagegen kam 4-Hydroxyphenylacetat nur bei 80 °C vor (**Tab. 15**). Diese beiden Metabolite haben zwar völlig unterschiedliche Massenspektren, ihr Retentionsindex ist jedoch fast identisch. Da beide Stoffe nie gleichzeitig in einer Probe detektiert werden konnten, ist zu vermuten, dass sie sich bei der Ionisierung gegenseitig beeinflussen und letztendlich der Stoff mit der höheren Konzentration detektiert wird. 1,3-Diaminopropan kommt im Polyaminstoffwechsel vor, während 4-Hydroxyphenylacetat im Aromatenstoffwechsel synthetisiert wird. Es wäre möglich, dass das Vorkommen dieser Metabolite ein Indiz für einen höheren Fluss durch die entsprechenden Stoffwechselwege ist.

Im Polyaminstoffwechsel konnten tatsächlich weitere hochregulierte Intermediate identifiziert werden, wie z.B. Putrescin und 4-Aminobutanoat (**Abb. 27** bzw. **45**). Wie bereits beim Vergleich mit anderen Organismen beschrieben, (**Kap. 4.3.1**) dienen Polyamine in extremophilen Organismen häufig dem Schutz von Zellstrukturen wie DNA und Proteinen. Da nicht alle detektierten Polyamine hochreguliert waren, haben vermutlich nur einige von ihnen eine Schutzfunktion bei der niedrigeren Temperatur oder es handelt

sich um hochregulierte Vorstufen für andere, nicht identifizierte Polyaminverbindungen. Die erhöhten Aminosäurekonzentrationen bei niedrigeren Temperaturen könnten zudem mit einer erhöhten Produktion von Polyaminen in Zusammenhang stehen. Aminosäuren fungieren als Vorstufen bei der Polyaminbiosynthese (Schneider und Wendisch, 2011)



**Abb. 45 (wie 27)** Schematische Darstellung eines Teils des Polyaminstoffwechsels. Identifizierte Metabolite werden durch farbige Pfeile symbolisiert. Sie sind bei 70 °C signifikant erhöht (grün), signifikant erniedrigt (rot) oder weisen keinen signifikanten Unterschied auf (gelb). Metabolite ohne Pfeil wurden nicht detektiert. Graue Pfeile deuten auf Metabolite hin, die bisher nicht in der verwendeten Stoffbibliothek vorhanden sind, ihre Präsenz aber aufgrund des Massenspektrums einiger unbekannter Peaks vermutet wird (siehe **Kap. 3.3.6**).

Weiterhin auffällig ist, dass alle identifizierten Zuckeralkohole bei 70 °C hochreguliert waren. Sollte es sich bei diesen Verbindungen tatsächlich um kompatible Solute handeln, würde dieses Ergebnis bedeuten, dass der Organismus diese bei Kälte akkumuliert, entgegen der Erwartungen, dass Polyole als Hitzeschutzprotektanten fungieren (Costa et al., 1998). Anzunehmen wäre auch, dass Polyole als Nebenprodukte der vermehrt synthetisierten Kohlenhydrate gebildet werden.

Eine andere Möglichkeit ist auch in diesem Fall eine allgemeine Abnahme der Enzymaktivitäten und damit eine Anhäufung der Substrate. Gesehen den Fall, dass Inositol zum größten Teil als Bestandteil der Biomembran in *S. solfataricus* synthetisiert wird, könnte eine erhöhte Inositol-Konzentration bei 70 °C auf eine gleichbleibende Synthese,

infolge des langsameren Wachstums jedoch auf einen langsameren Verbrauch hinweisen. Falls das bereits in die Zellmembran integrierte Inositol bei der Aufarbeitungsprozedur zusammen mit den Lipiden verworfen wird, wird in der Analyse lediglich die freie intrazelluläre Konzentration nachgewiesen.

Herunterregulierte Konzentrationen von AMP und einigen Nukleotidbasen, wie Adenin, Adenosin und Thymin könnten ein Hinweis dafür sein, dass der Organismus bei der niedrigen Temperatur Energie einspart. Die Synthesewege für diese Metabolite sind sehr lang und energieaufwendig. Möglicherweise fährt der Organismus bei 70 °C entsprechende Stoffwechselwege herunter, da er die Verbindungen aufgrund des langsameren Wachstums nicht in großen Mengen benötigt.

Es konnte gezeigt werden, dass die Metabolite, die in der Hauptkomponentenanalyse den größten Einfluss auf die Trennung der einzelnen Proben hatten (siehe **Abb. 23**), starke signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Zuständen aufwiesen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass *S. solfataricus* seinen Zentralstoffwechsel bei 70 °C wahrscheinlich in Form eines hochregulierten nicht-phosphorylierenden und eines herunterregulierten semi-phosphorylierenden ED-Weges an die niedrigere Temperatur adaptiert. Ein möglicher Grund ist die Umgehung des instabilen 1,3-Bisphosphoglycerats im semi-phosphorylierenden ED-Weg, bei dessen Umsetzung vermutlich ein Energieverlust stattfinden könnte. Weitere Anpassungen lassen sich in peripheren Stoffwechselwegen verzeichnen, insbesondere hochregulierte Metabolitkonzentrationen im Aminosäure-, Zucker- und Polyaminstoffwechsel.

#### 4.3.2.2 65 °C verglichen mit 70 °C

Wurde die Kultivierungstemperatur um weitere 5 °C herabgesetzt, resultierten weitere Veränderungen im Stoffwechsel (**Abb. 28**). Im Vergleich mit Proben, die bei 70 °C kultiviert worden waren, kamen bei 65 °C einige Metabolite in erniedrigten Konzentrationen vor. Besonders auffällig waren herunterregulierte Intermediate des Zitronensäurezyklus, wie Citrat, Fumarat und Malat. Dies könnte auf eine insgesamt schlechtere Energiebilanz hindeuten. Erniedrigte Konzentrationen der Nukleotidbasen Adenosin und Uracil untermauerten diese Hypothese. Gleichzeitig zeigte eine erniedrigte Konzentration von Nicotinamid und AMP, dass der Organismus bei 65 °C, was bereits sehr

nahe am Temperaturminimum liegt, eine schlechtere Energiebilanz hat als bei 70 °C. Wie bereits erwähnt, ist die Synthese von Energieträgern und Koenzymen, wie NADP und AMP, sehr energieaufwendig. Wahrscheinlich wird die Synthese bei 65 °C noch stärker eingeschränkt. Eine herunterregulierte Fructose-6-phosphat-Konzentration könnte bedeuten, dass ein geringerer Fluss durch die Gluconeogenese stattfindet, der ebenfalls schon bei 70 °C im Vergleich mit 80 °C zu beobachten war. Erniedrigte Konzentrationen der Zucker Galactose und Fructose bekräftigten die Vermutung einer verminderten Synthese von Kohlenhydraten.

Allerdings waren die Konzentrationen von Trehalose und Lactose nicht signifikant verändert im Vergleich zu 70 °C. Diese Verbindungen könnten, wie bereits für 70 °C beschrieben, eine wichtige Rolle im Kälteschutzmechanismus spielen.

Auffällig waren auch stark herunterregulierte Konzentrationen von zwei *Unknowns* bei 65 °C. Unknown-P2-011 konnte lediglich bei 70 °C detektiert werden. Diese Verbindungen kamen auch bei 70 °C in niedrigeren Konzentrationen vor. Unknown-P2-009 ist bei 65 °C herunterreguliert. Dieser war jedoch bei 70 °C im Vergleich zu 80 °C hochreguliert (siehe **Kap. 3.3.6**). Falls es sich tatsächlich um ein Derivat von Malat handelt, würde das Ergebnis zu den herunterregulierten Intermediaten des Zitronensäurezyklus passen. Bei 70 °C waren diese nicht signifikant verändert.

Metabolite des nicht-phosphorylierenden ED-Weges sowie alle identifizierten Aminosäuren, Zuckeralkohole und Polyamine wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen 65 °C und 70 °C auf. Somit kann konstatiert werden, dass der Organismus diese spezifischen Adaptationen an die niedrigere Temperatur auch bei 65 °C ausübt.

### 4.3.3 Kälteschock von 80 °C auf 65 °C

Der Vergleich der metabolischen Profile von Zellen, die einem plötzlichen Kälteschock von 80 °C auf 65 °C ausgesetzt wurden, und Zellen, welche kontinuierlich bei der niedrigeren Temperatur kultiviert wurden, könnte weitere Einblicke in den Stoffwechsel von *S. solfataricus* liefern. Die PCA in **Abb. 29 (Kap. 3.3.3)** zeigt die Gruppierung von Proben vor dem Kälteschock, 1 und 23 Stunden nach dem Kälteschock (80 °C) sowie Proben aus einer kontinuierlichen 65 °C-Kultur. Es war deutlich zu sehen, dass die Proben vor dem Kälteschock und 1 Stunde nach dem Kälteschock zusammen clustern. Die Proben 23 Stunden nach dem Kälteschock grenzten sich dagegen ganz deutlich ab und lagen näher



an den kontinuierlichen 65 °C-Proben, obwohl diese im Gegensatz zu den Proben vor und nach dem Kälteschock aus einer separaten biologischen Kultur stammten. Dieses Ergebnis beweist, dass schon nach 23 Stunden weitreichende Veränderungen im Stoffwechsel stattgefunden haben, die dem Zustand einer kontinuierlichen Kultivierung bei dieser Temperatur nahekommen. Eine genauere Analyse der einzelnen Metabolite ergab, dass neben einigen unbekannten Verbindungen Tyrosin und 5'-Methylthioadenosin den größten Einfluss auf die Trennung der Proben hatten.

Beim Vergleich der Proben vor dem Kälteschock mit den Proben eine Stunde danach waren relativ wenig signifikante Unterschiede der Metabolitkonzentrationen sichtbar (**Abb. 30**). So waren z.B. KDG, Galacturonat und Glutamat leicht erhöht, während Tyrosin ausschließlich in den Proben nach dem Kälteschock detektiert werden konnte. Einige Metabolite, wie Lactose, Xylulose-5-phosphat und Malonat waren dagegen etwas niedriger konzentriert. Ein möglicher Grund wäre, dass einige Metabolite nach dem Kälteschock aufgrund geringerer Enzymaktivitäten akkumulieren bzw. ihre Produktion verlangsamt wird. Wichtig zu erwähnen ist auch, dass das Zellwachstum nach dem Kälteschock erwartungsgemäß stagnierte. Nach 23 Stunden entsprach die Wachstumsrate in etwa der einer kontinuierlichen 65 °C-Kultur. Beim Vergleich von Proben vor und 23 h nach dem Kälteschock fiel auf, dass zahlreiche weitere Metabolite aufgrund des Kälteschocks akkumuliert waren (**Abb. 31**). Es handelte sich unter anderem um Metabolite des Zentralstoffwechsels, Aminosäuren und Zuckeralkohole. Das entsprach den Veränderungen bei kontinuierlichen Kultivierungen bei 65 °C und 70 °C (**Kap. 3.3.2.1** und **3.3.2.2**). Ein großer Unterschied ist jedoch, dass Glucose-6-phosphat und Fructose-6-phosphat, im Gegensatz zu den kontinuierlichen Versuchen, nach dem Kälteschock hochreguliert waren. Herunterreguliert wurde in dem 22-stündigen Zeitraum nur wenig. Lediglich die Monosaccharide Galactose und Xylose waren erniedrigt. Bei der Betrachtung des Vergleichs zwischen den Proben 23 Stunden nach dem Kälteschock und einer separaten kontinuierlichen 65 °C-Kultur schien auf den ersten Blick die Streuung, und somit die Unterschiede unter den Metaboliten, größer zu sein als zwischen den 80 °C Proben und 23 h nach dem Kälteschock (**Abb. 32**). Dies wird vermutlich aufgrund der biologischen Varianz der zwei Kulturen bewirkt. Die meisten Unterschiede beruhten jedoch auf nicht bekannten Peaks. Signifikante Veränderungen von identifizierten Metaboliten waren einerseits höhere Konzentrationen von Glucose-6-phosphat und Fructose-6-phosphat in

den Kälteschockproben im Vergleich zur kontinuierlichen 65 °C-Kultur. Außerdem wurde auch hier wieder Tyrosin detektiert. Die großen Konzentrationsunterschiede von Tyrosin stehen in Relation zum Einfluss dieser Verbindung auf die Trennung in der Hauptkomponentenanalyse (siehe **Abb. 29**).

Interessant war auch bei diesem Experiment das Vorkommen von 4-Hydroxyphenylacetat in den 80 °C-Proben vor dem Kälteschock, während 1,3-Diaminopropan nur in der 65 °C-Kultur detektiert wurde. Doch auch nach 23 h bei 65 °C wurde lediglich 4-Hydroxyphenylacetat detektiert. Falls diese beiden Metabolite sich, wie bereits beschrieben, bei der GC-MS-Analyse tatsächlich gegenseitig beeinflussen, reichen 23 h bei der niedrigeren Temperatur möglicherweise nicht aus, um 1,3-Diaminopropan detektieren zu können. Wahrscheinlich handelt es sich bei den entsprechenden Stoffwechselwegen um langsame Anpassungen an die niedrige Temperatur.

In der 65 °C-Kultur waren Metabolite wie Galactosamin, KDG, Lactose, Erythritol, Isoleucin, sowie die zwei *Unknowns* P2-009 und P2-012 hochreguliert. All diese Metabolite waren auch bei niedrigeren Temperaturen bei den kontinuierlichen Versuchen hochreguliert, wie bereits beschrieben wurde.

Anhand einiger ausgewählter Metabolite sollte exemplarisch das Verhalten der Metabolite in allen vier Zuständen demonstriert werden (**Abb. 33**). Einige Metabolite, wie 5'-Methylthioadenosin und Valin, veränderten ihre Konzentration nach einer Stunde bei 65 °C kaum oder gar nicht, während sie sich nach 23 Stunden an die Konzentration der jeweiligen Metabolite in der kontinuierlichen 65 °C-Kultur angepasst haben. Andere Verbindungen, wie hier am Beispiel von Inositol gezeigt wurde, veränderten schrittweise ihre Konzentration und zeigten schon nach einer Stunde signifikante Veränderungen. Viele Metabolite passten sich jedoch am Ende nicht an die kontinuierliche 65 °C-Kultur an, wie hier Glucose-6-phosphat. In der Kälteschock-Kultur stieg die Konzentration an, verglich man sie aber mit der kontinuierlichen Kultur, wies diese eine niedrigere Konzentration des Metabolits auf. Auch KDG stieg nach dem Kälteschock zwar an, die Konzentration in der kontinuierlichen 65 °C-Kultur war jedoch höher. Bei dieser Art von Metaboliten hat wahrscheinlich die Zeit von 23 Stunden nicht ausgereicht, um den Stoffwechsel komplett an den anderen Zustand anzupassen. Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass der Organismus bereits nach 23 Stunden, was bei 65 °C weniger als einer Generationszeit entspricht, seinen Stoffwechsel teilweise an die neue Umgebung, in diesem Fall eine

plötzliche Temperaturänderung, adaptieren kann. Dies gilt jedoch nicht für alle Metabolite. Um das weiter zu erörtern, wäre es sinnvoll das metabolische Profil auch noch nach mehreren Generationszeiten zu analysieren.

### Vergleich mit Proteomdaten

Die zum Kälteschock-Experiment vorliegenden Proteomdaten (Chong, unveröffentlicht) wiesen einige Übereinstimmungen mit den Metabolomdaten auf. Auffällig waren zahlreiche hochregulierte Enzyme 23 Stunden nach dem Kälteschock, die bei der Synthese von Aminosäuren eine Rolle spielen. Beispielsweise die 2-Isopropylmalat-Synthase (2.3.3.13), die Ketol-acid-Reductoisomerase (1.1.1.86) und die Dihydrodipicolinat-Synthase (4.2.1.52), welche im Lysin-, Leucin-, Isoleucin- und Valinmetabolismus vorkommen. Wie die in dieser Arbeit erhobenen Metabolomdaten zeigten, waren diese Aminosäuren bei Kälte stets hochreguliert. Weiterhin war die Gluconatdehydratase hochreguliert, welche im zentralen Kohlenhydratstoffwechsel Gluconat zu KDG umsetzt. Dieses Ergebnis passt ebenfalls zu den Metabolomvergleichen, die gezeigt haben, dass KDG bei niedrigeren Temperaturen hochreguliert ist. Interessant war außerdem die erhöhte Konzentration einer Untereinheit der  $\alpha$ -Oxoglutarat-ferredoxin-oxidoreductase (1.2.7.3) nach dem Kälteschock. Das Enzym katalysiert die Reaktion von 2-Ketoglutarat zu Succinyl-CoA im Zitronensäurezyklus. Daraus könnten evtl. auch höhere Succinat-Konzentrationen resultieren. Succinat war nach dem Kälteschock zwar nicht signifikant verändert, wies aber beim Vergleich zwischen kontinuierlichen 65 °C- und 70 °C-Proben als einzige detektierte Verbindung des Zitronensäurezyklus eine unveränderte Konzentration auf, während alle anderen Intermediate herunterreguliert waren (siehe **Kap. 3.3.2.2**). Das Enzym 3-Dehydroquinate-synthase (4.2.3.4), das bei der Synthese aromatischer Aminosäuren aktiv ist, war ebenfalls hochreguliert. Dies steht womöglich in Relation mit dem identifizierten Tyrosin eine und 23 Stunden nach dem Kälteschock. An der erhöhten Fructose-6-phosphat-Konzentration könnte neben einer Akkumulation aufgrund verringerter Enzymaktivitäten auch das Enzym 6-Phospho-3-hexuloisomerase (5.2.1.27) verantwortlich sein, das nach dem Kälteschock hochreguliert war. Es katalysiert die Reaktion zwischen D-Arabino-Hex-3-ulose-6-phosphat und Fructose-6-phosphat im Pentosephosphatweg (PPP). Auch die Transketolase aus dem PPP war hochreguliert, was auf einen verstärkten Fluss durch diesen Stoffwechselweg hindeutet. Die Metabolomdaten

zeigten ein gegensätzliches Ergebnis, da die einzige detektierbare Verbindung des PPP, nämlich Xylulose-5-phosphat, nach dem Kälteschock herunterreguliert war.

Übereinstimmungen fanden sich jedoch weiterhin im Galactose-Metabolismus. 23 Stunden nach dem Kälteschock war die UDP-Glucose-4-epimerase (5.1.3.2), welche UDP-Glucose in UDP-Galactose umwandelt, stark herunterreguliert. Einstimmig dazu wurde Galactose in dieser Probe lediglich in der Referenzprobe vor dem Kälteschock detektiert, d.h. sie lag 23 Stunden nach dem Kälteschock unter dem Detektionslimit. Außerdem war das Enzym 3-Hydroxyisobutyrate-dehydrogenase (1.1.1.31) herunterreguliert. Dies zeigte ebenfalls Übereinstimmung mit den Metabolomdaten und den restlichen Proteomdaten, da es im Abbauweg von Valin vorkommt. Valin war bei Kälte stets in erhöhten Konzentrationen vorhanden.

### **4.3.4 Hitzeschock von 80 °C auf 88 °C**

Neben möglichen Anpassungsstrategien bei Temperaturen unterhalb des Optimums war es außerdem interessant zu untersuchen, wie der Stoffwechsel auf Temperaturen über 80 °C reagiert. Als Hitzeschocktemperatur wurde 88 °C ausgewählt, in Anlehnung an Literaturdaten (Martusewitsch 2004, Tachdjian und Kelly, 2006). Dabei wurde eine 80 °C-Kultur, welche sich im exponentiellen Wachstum befand, für 60 Minuten bei 88 °C weiterkultiviert. Es liegen bereits Transkriptomstudien zum Verhalten von *S. solfataricus* nach einem Hitzeschock vor (Tachdjian und Kelly, 2006). Bei dem Versuch wurde das Kulturmedium von 80 °C auf 90 °C erhitzt und Proben kurz vor dem Shift und 5, 30 und 60 Minuten nach dem Shift genommen. Es konnte gezeigt werden, dass schon nach 5 Minuten bei 90 °C etwa ein Drittel des Transkriptoms Veränderungen aufwies und viele Gene hoch- oder herunterreguliert waren. *S. solfataricus* gehört zu den Organismen, die als Antwort auf Hitzestress kleine Hitzeschockproteine, die sog. Chaperonine, synthetisieren können (Laksanalami und Robb, 2004). Diese Proteinfamilien sind in Extremophilen weit verbreitet.

Bei dieser Temperatur ist eine ausgeprägte Anpassung zu erwarten. Würde der Organismus von Beginn an bei 88 °C kultiviert werden, würde kein Wachstum stattfinden. Die Zellen müssten schrittweise an immer höhere Temperaturwerte adaptiert werden. In der Stunde nach dem Hitzeschock fand kein weiteres Wachstum mehr statt. Anders als erwartet, zeigte der Vergleich der relativen Metabolitkonzentrationen von Zellen vor und nach dem

Hitzeschock kaum Veränderungen (**Kap. 3.3.4, Abb. 34**). Lediglich einige Aminosäuren waren nach der einstündigen Hitzeeinwirkung hochreguliert. Das gesamte Proteinrepertoire der Zelle ist nach einem Hitzeschock aufgrund der vermehrten Bildung von Hitzeschockproteinen höher, somit müssen auch mehr Aminosäuren zur Verfügung stehen. Weiterhin war die organische Säure 4-Aminobutanoat bei 88 °C mit Faktor 6.81 (siehe Anhang, **Tab. 27**) stark erhöht. 4-Aminobutanoat ist ein Vorläufer von Succinat, Glutamat und anderen Aminosäuren und entsteht unter anderem beim Abbau von Putrescin. Die stark herunterregulierte Putrescinkonzentration steht in Relation zu diesem Ergebnis. Da Putrescin bei Temperaturen unterhalb des Optimums in höheren Konzentrationen vorkam (siehe **Kap. 3.3.2.1**), kann angenommen werden, dass es im Gegensatz zu hohen bei niedrigen Temperaturen eine wichtige Funktion übernimmt. Nach dem Hitzeschock könnte es allerdings als Vorstufe für Hitzeschutzverbindungen, wie z.B. Polyaminen, dienen und schneller umgesetzt werden, was zu der erniedrigten Konzentration führen könnte. Tatsächlich lag neben Putrescin auch Spermidin nach dem Hitzeschock in leicht verminderten Konzentrationen vor. Wie bereits erwähnt zeigten frühere Untersuchungen zur Polyaminausstattung in *S. solfataricus*, dass der Organismus bei niedrigeren Temperaturen mehr kurzkettige Polyamine wie Putrescin, Spermidin und Caldin (Norspermidin) synthetisiert. Je weiter die Temperatur ansteigt, desto mehr länger-kettige Polyamine überwiegen, hauptsächlich Spermin und Thermin (Norspermin) (Friedman und Oshima, 1989). Diese Tatsache könnte mit den detektierten Unknowns-P2-016 und P2-113 übereinstimmen, die möglicherweise Caldin und Thermin entsprechen könnten (**Kap. 3.3.6 und 4.3.6**).

Weiterhin ist auffällig, dass Intermediate des Zitronensäurezyklus nach dem Hitzeschock erhöht vorlagen bzw. eine Tendenz dazu zeigten (**Tab. 16**). Auch diese Beobachtung lässt sich durch eine gesteigerte Protein- und Aminosäuresynthese erklären, was einen stärkeren Durchfluss durch den Zitronensäurezyklus - und damit vermehrt Vorstufen für die Biosynthese - voraussetzt. Erhöhte Uracil-Konzentrationen könnten auf eine vermehrte Synthese von RNA hindeuten, was ebenfalls eine erhöhte Proteinbiosynthese zur Folge haben könnte.

Eine weitere interessante Beobachtung ist die Verringerung der Konzentration von Zuckeralkoholen nach dem Hitzeschock. Auch bei dieser Stoffklasse verhielt es sich bei niedrigen Temperaturen gegensätzlich. Es wäre möglich, dass Zuckeralkohole lediglich

zum Kälteschutz synthetisiert werden und somit bei Hitze in geringeren Konzentrationen vorkommen. Möglicherweise werden sie sogar abgebaut, um auf schnellem Weg neue Vorstufen für andere benötigte Metabolite bzw. Energie zu generieren. Phosphorylierte Verbindungen wie Glucose-6-phosphat und Fructose-6-phosphat waren ebenfalls leicht herunterreguliert nach dem Hitzeschock.

Auffällig war außerdem eine erniedrigte Lactose-Konzentration, während sie bei kälteren Temperaturen stark hochreguliert war. Auch hier verhielt sich die Lactose-Konzentration ähnlich wie die Konzentration der Trehalose. Diese war ebenfalls erniedrigt nach dem Hitzeschock. Eine mögliche Erklärung ist, dass der Organismus auf Metabolomebene, ganz im Gegensatz zu Temperaturen unter dem Optimum, keine Schutzverbindungen akkumuliert, sondern den gesamten Stoffwechsel auf die Synthese von Hitzeschockproteinen ausrichtet.

### 4.3.5 Stamm PBL 2025 und *knock out* Mutante PBL 2025 $\Delta$ SSO3195

Für weitreichendere Einblicke in den zentralen Kohlenhydratstoffwechsel von *S. solfataricus* wurde das Metabolom einer *knock out* Mutante analysiert. Die Herstellung von *knock out* Mutanten konnte bisher jedoch nur mit einem verwandten Stamm des P2 1617 durchgeführt werden, und zwar mit PBL 2025, einem Abkömmling des *S. solfataricus*-Stammes 98/2. PBL 2025 selbst ist eine natürliche Deletionsmutante, welcher etwa 50 Gene fehlen (Albers und Driessen, 2007). Darunter befinden sich Gene, die für Glycosylhydrolasen codieren, welche wiederum den Abbau von  $\beta$ -verknüpften Disacchariden katalysieren. Daher war es zunächst wichtig, das metabolische Profil des PBL-Stammes mit dem im Rahmen dieser Arbeit hauptsächlich verwendeten P2-Stamm zu vergleichen, bevor schließlich PBL 2025 der *knock out*-Mutante PBL 2025 $\Delta$ SSO3195 gegenübergestellt werden konnte.

#### 4.3.5.1 Vergleich von PBL 2025 mit P2 1617

Bereits im *TIC* war ein großer Unterschied zwischen den metabolischen Profilen von PBL 2025 und P2 1617 zu erkennen. Der PBL-Stamm enthielt einen zusätzlichen Peak mit hoher Intensität. Es handelte sich dabei um das Disaccharid Lactose, welche um Faktor 74 erhöht war (**Kap. 3.3.5.1, Abb. 35**). Dies steht im Einklang mit der natürlichen Deletion der Gene SSO3004 - SSO3050, die unter anderem das *lacS*-Gen für den Lactose-

Katabolismus enthalten. Das Enzym ist die  $\beta$ -Galactosidase (3.2.1.23), welche die Umsetzung von Lactose zu Galactose katalysiert. Tatsächlich war Galactose im PBL-Stamm signifikant herunterreguliert. Die genauere Datenauswertung zeigte neben Lactose weitere Kohlenhydrate, wie Palatinose, Mannose, Rhamnose und auch Fructose, die im PBL-Stamm hochreguliert waren (**Abb. 36**). In der Deletionsmutante waren außer  $\beta$ -Galactosidase noch weitere Enzyme aus der Familie der Glycosidasen ausgeschaltet. Auch Trehalose war signifikant erhöht im PBL-Stamm, wobei dies nicht auf die Deletion zurückzuführen ist, denn die Gene für den Trehalose-Abbau befinden sich in anderen Genregionen. Lediglich ein Disaccharid war im P2-Stamm höher konzentriert. Hierbei handelt es sich vermutlich um Cellobiose, Maltose oder einen anderen Zucker mit ähnlichem Massenspektrum und RI. Da diese Verbindung im PBL-Stamm nicht akkumuliert wurde, ist anzunehmen, dass die betreffenden Gene für den Abbau nicht deletiert sind.

Sehr auffällig war das Fehlen einiger Zuckeralkohole wie Erythritol und Mannitol bzw. Sorbitol im PBL-Stamm. Wie bereits erwähnt entstehen Zuckeralkohole unter anderem als Nebenprodukte bei der Umsetzung von Kohlenhydraten, beispielsweise aus Galactose über das Enzym  $\alpha$ -Galactosidase (3.2.1.22), welches in PBL 2025 ebenfalls fehlte. Bei der Umsetzung von Glucuronosiden zu Glucuronat fallen ebenfalls Zuckeralkohole an. Da auch das entsprechende Enzym  $\beta$ -Glucuronidase (3.2.1.31) im PBL-Stamm nicht vorhanden ist, wäre das eine weitere mögliche Erklärung für das Fehlen von Zuckeralkoholen. Entgegengesetzt war jedoch das Vorkommen von Glucuronat ausschließlich im PBL-Stamm. Glucuronat muss also folglich über einen anderen Stoffwechselweg synthetisiert worden bzw. beim Abbau entstanden sein, z.B. über *myo*-Inositol oder UDP-Glucose. Intermediate des Inositol-phosphat-Metabolismus wie *myo*-Inositol und *myo*-Inositol-1-phosphat wiesen erhöhte Konzentrationen im PBL-Stamm auf, was auf eine höhere Produktion von Glucuronat hindeuten könnte.

Die Intermediate der Gluconeogenese, Glucose-6-phosphat und Fructose-6-phosphat, waren im PBL-Stamm stark erhöht, ebenso Glyceraldehyd, Pyruvat und Dihydroxyacetonphosphat. Metabolite des Zitronensäurezyklus waren im PBL-Stamm ebenfalls hochreguliert. Diese Ergebnisse deuten auf einen stärkeren Durchfluss durch den zentralen Kohlenhydratstoffwechsel, was in Relation zur höheren Wachstumsrate von PBL 2025 im Vergleich zu P2 1617 steht. Erhöhte Konzentrationen von AMP könnten ebenfalls auf eine

positive Energiebilanz hinweisen. Interessanterweise waren Nukleotid- bzw. Nukleosidverbindungen wie Adenin und Adenosin im P2-Stamm erhöht. Auch das Nucleosid 5'-Methylthioadenosin kam im P2-Stamm erhöht vor und könnte auf einen verstärkten Fluss durch den Polyaminstoffwechsel hindeuten. Andere identifizierte Verbindungen des Polyaminstoffwechsels waren jedoch in beiden Organismen gleich konzentriert. Eine erhöhte Inositolkonzentration im PBL-Stamm könnte mit einer vermehrt stattfindenden Synthese der Biomembran erklärt werden, was in Relation zur höheren Wachstumsrate steht.

Interessant ist weiterhin eine erhöhte Konzentration von Homoserin-lacton im P2-Stamm im Vergleich zum PBL-Stamm. Zur Funktion dieses Metabolits lassen sich jedoch keine Angaben machen.

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass zwischen den beiden Stämmen P2 1617 und PBL 2025 viele bedeutende Unterschiede im Stoffwechsel bestehen, was infolge der unterschiedlichen Wachstumsraten auch zu erwarten war. Einige der Differenzen können eindeutig auf die Deletion des chromosomalen Abschnittes im PBL 2025 zurückgeführt werden.

#### 4.3.5.2 Vergleich von PBL 2025 mit *knock out* Mutante PBL 2025 $\Delta$ SSO3195

Das Fehlen der KDG-Kinase-Aktivität in der *knock out*-Mutante PBL 2025 $\Delta$ SSO3195 hat, wie in **Kap. 3.1.4** gezeigt, kaum Auswirkungen auf das Wachstum des Organismus. Auf Stoffwechselebene ließen sich jedoch einige Veränderungen beobachten, die erwartungsgemäß im zentralen Kohlenhydratstoffwechsel am größten waren (**Kap. 3.3.5.2, Abb. 37**). Das unmittelbare Substrat des betroffenen Enzyms – KDG – war am stärksten verändert. Da es nicht phosphoryliert werden kann, besteht nicht die Möglichkeit, in Form von KDPG in den semi-phosphorylierenden Zweig des ED-Weges einzutreten. KDG akkumulierte somit in der Mutante und lag um Faktor 32 erhöht vor. Aufgrund der Annahme, dass für den Glucose-Abbau normalerweise beide ED-Wege gleichzeitig aktiv sind, muss somit in der Mutante ein höherer Fluss durch den nicht-phosphorylierenden Weg vorliegen. Dies wurde durch die erhöhten Konzentrationen von Glyceraldehyd und Glycerat bestätigt. Pyruvat konnte lediglich in der Mutante detektiert werden, ähnlich wie auch bei 70 °C im Vergleich zu 80 °C (**siehe Kap. 3.3.2.1**). Wahrscheinlich wurde es auch hier bei der Umsetzung von KDG zu Glyceraldehyd angehäuft. Metabolite der



Gluconeogenese, Glucose-6-phosphat und Fructose-6-phosphat, waren in der Mutante dagegen herunterreguliert. Aufgrund des *knock outs* der KDG-Kinase kann klar postuliert werden, dass der semi-phosphorylierende Weg in katabolischer Richtung nicht aktiv ist, zumindest die Reaktionen bis zum Glyceraldehyd-3-phosphat. GAP ist, wie bereits in **Kap. 4.3.2.1** beschrieben, das Schlüsselintermediat für die Gluconeogenese und den Pentosephosphatweg. In der Mutante kann GAP ausschließlich über den Umweg des nicht-phosphorylierenden ED-Weges und des anabolischen unteren EMP-Weges unter Energieaufwand synthetisiert werden. Dabei könnte zusätzlich im Fall eines hitzelabilen 1,3-Bisphosphoglycerats aufgrund eines sinnlosen Kreislaufs Energie verloren gehen (siehe **Kap. 1.1.2**). Die verringerten Konzentrationen von Glucose-6-phosphat und Fructose-6-phosphat könnten also dadurch erklärt werden, dass zu wenig GAP synthetisiert und somit die Gluconeogenese herunterreguliert wurde. Wie schon erwähnt, konnten zu den Metabolitkonzentrationen im semi-phosphorylierenden ED-Weg keine Aussagen getroffen werden.

Interessanterweise waren jedoch sämtliche identifizierte Mono- und Disaccharide in der Mutante herunterreguliert, ganz im Gegensatz zum Wildtyp (P2) bei niedrigeren Temperaturen (**Kap. 3.3.2.1**). Damit können die verringerten Fructose-6-phosphat- und Glucose-6-phosphat-Konzentrationen hier nicht mit einer verstärkten Kohlenhydrat-synthese begründet werden.

Auffällig ist, dass der Lactose-Peak in der Mutante um fast die Hälfte niedriger war als im PBL 2025. Auch andere Zucker, wie Mannose, Xylulose und Palatinose kamen in der Mutante in niedrigeren Konzentrationen vor. Da die natürliche Deletion ebenso für PBL 2025 $\Delta$ SSO3195 wie für PBL 2025 gilt, müssen die niedrigeren Zuckerkonzentrationen im Zusammenhang mit dem *knock out* der KDG-Kinase stehen. Die natürliche Deletion betrifft lediglich den Abbau der Zucker. Eine mögliche Erklärung wäre demnach, dass in der Mutante aufgrund einer eingeschränkten Gluconeogenese-Aktivität durch den blockierten semi-phosphorylierenden ED-Weg insgesamt weniger Mono- und auch Disaccharide synthetisiert wurden. Dies gilt auch für den Speicherstoff Trehalose, der sowohl aus Glycogen als auch über Glucose gebildet werden kann. Womöglich reduziert der Organismus aufgrund der verringerten Gluconeogenese auch die Synthese dieses kompatiblen Soluts.

Eine herunterregulierte Konzentration von Fructose-6-phosphat in der Mutante könnte, wie

auch schon im P2-Stamm bei 70 °C vermutet (**Kap. 4.3.2.1**) auf einen verstärkten Fluss durch den Pentosephosphatweg hindeuten. Die einzige identifizierte Verbindung aus dem PPP ist Xylulose-5-phosphat, die jedoch ebenfalls herunterreguliert war.

Trotz dieser Veränderungen wies die Mutante lediglich eine geringfügig niedrigere Wachstumsrate auf als PBL 2025, was den Schluss zulässt, dass der nicht-phosphorylierende ED-Weg für einen effizienten Glucosekatabolismus ausreichend ist und Einschränkungen in der Gluconeogenese sowie im Pentosephosphatweg nicht essentiell für das Wachstum von *S. solfataricus* sind. Dementsprechend konnten im Zitronensäurezyklus zwischen PBL 2025 und PBL 2025ΔSSO3195 keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, im Gegensatz zum Vergleich mit dem P2-Stamm, der eine niedrigere Wachstumsrate und gleichzeitig herunterregulierte Konzentrationen von Intermediaten des Zitronensäurezyklus im Vergleich zum PBL-Stamm aufwies.

Alle identifizierten Nukleinbasen, Adenin, Adenosin und Uracil, waren in der Mutante erhöht, was auf eine effiziente Energiebilanz hindeutet. Eine interessante Beobachtung war die starke Erhöhung (Faktor 28) des unbekannten Peaks Unknown-P2-002 in der Mutante. Bei dieser Verbindung handelt es sich vermutlich um einen Zuckeralkohol (siehe **Kap. 3.3.6**). Bei einem zweiten unbekannten Peak, nämlich Unknown-P2-028, der ebenfalls in der Mutante hochreguliert vorlag, handelt es sich dem Massenspektrum nach ebenfalls um eine Zuckerverbindung. Wahrscheinlich sind beide *Unknowns* Nebenprodukte, die aus den akkumulierten Metaboliten resultierten. Eine andere Möglichkeit wäre, dass der Organismus Metabolite zur Adaptation bzw. Regulation - aufgrund der Umstellung des Stoffwechsels - synthetisiert.

Weiterhin auffällig waren die Metabolite 5'-Methylthioadenosin und 2-Hydroxyglutarat, die in der Mutante ebenfalls hochreguliert waren. Außer 5'-Methylthioadenosin waren jedoch alle anderen identifizierten Metabolite des Polyaminstoffwechsels unauffällig. 2-Hydroxyglutarat, ein Intermediat des Butyrat-Metabolismus, lag in der Mutante hochreguliert vor.

Homoserin-lacton konnte interessanterweise ausschließlich im PBL 2025 detektiert werden und lag in der Mutante vermutlich unter dem Detektionslimit. Wie bereits beschrieben ist unklar, welche Funktionen dieser Metabolit in der Zelle einnimmt.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass das Ausschalten eines einzigen Gens zahlreiche Unterschiede im Stoffwechsel bewirken kann, zumal es sich hier um einen *knock out* im Zentralstoffwechsel handelt. Entsprechend gehen die identifizierten Veränderungen in der Mutante auch über den Zentralstoffwechsel hinaus und betreffen viele periphere Wege, die direkt oder indirekt vom Zentralstoffwechsel abzweigen.

#### 4.3.5.3 PBL 2025 und PBL 2025 $\Delta$ SSO3195 bei 70 °C und 80 °C

Abschließend wurde die *knock out*-Mutante PBL 2025 $\Delta$ SSO3195 einer Kultivierung unterhalb des Temperaturoptimums unterzogen, um eventuelle weitere Anpassungen eines bereits veränderten zentralen Kohlenhydratstoffwechsels ergründen zu können. Diese Ergebnisse lieferten einige interessante Beobachtungen. Für einen sinnvollen Vergleich wurden ebenfalls Metabolomdaten des PBL 2025 bei 70 °C und 80 °C generiert. Das Ergebnis der Hauptkomponentenanalyse zeigte eine deutliche Trennung beider Stämme bei jeweils 70 °C und 80 °C (**Kap. 3.3.5.3, Abb. 38**). Es zeichnete sich jedoch ab, dass PBL 2025 zwischen 70 °C und 80 °C eine etwas größere Distanz aufwies als PBL 2025 $\Delta$ SSO3195 zwischen beiden Temperaturen. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass der Einfluss der niedrigeren Temperatur auf die Metabolitkonzentrationen im PBL 2025 stärker war als im PBL 2025 $\Delta$ SSO3195. Eine genauere Analyse ergab, dass neben Xylulose und Glucose-6-phosphat die drei unbekannten Verbindungen Unknown-PBL-005, Unknown-PBL-022 und Unknown#bth-pae-056 den größten Einfluss auf die Trennung der einzelnen Zustände hatten. Dementsprechend waren die beiden PBL-*Unknowns* in der Mutante stark hochreguliert im Vergleich zum PBL 2025 (siehe Anhang, **Tab. 29**).

Um die Unterschiede der einzelnen Zustände weiter zu verdeutlichen, wurden die Proben zusätzlich in einer Hierarchischen Clusteranalyse (HCA) dargestellt. Interessanterweise konnte mit einem Vergleich aller drei hier analysierter Stämme bei 70 °C und 80 °C gezeigt werden, dass die PBL 2025-Proben bei 70 °C tatsächlich größere Unterschiede zu allen übrigen PBL-Proben aufwiesen (**Abb. 39**). Sie ergaben mit den Proben des P2-Stammes bei beiden Temperaturen das erste Hauptcluster, während die PBL 2025-Proben bei 80 °C zusammen mit den PBL 2025 $\Delta$ SSO3195-Proben bei beiden Temperaturen das zweite Hauptcluster darstellten. Dieses Ergebnis lässt, wie bereits oben beschrieben, vermuten, dass der Temperatureinfluss auf den Stoffwechsel von PBL 2025 stärker war als auf den

Stoffwechsel von PBL 2025 $\Delta$ SSO3195.

Im Zentralstoffwechsel konnten beide Effekte - einerseits die Auswirkungen der Temperatur und andererseits die des *knock outs* - beobachtet werden. Besonders anhand der KDG-Konzentration ist deutlich zu erkennen, dass der Metabolit zum einen durch die Mutation stark akkumulierte, die Konzentration jedoch durch die niedrigere Temperatur - wahrscheinlich aufgrund eines erhöhten Durchflusses durch den nicht-phosphorylierenden ED-Weg - nochmals weiter anstieg (**Abb. 40**). Dasselbe gilt für Glyceraldehyd und Glycerat, wobei bei Letzterem die Konzentration bei 70 °C und 80 °C keinen signifikanten Unterschied aufwies. Glyceraldehyd konnte im PBL 2025 nicht detektiert werden, da es vermutlich unter dem Detektionslimit lag. Dasselbe gilt für Pyruvat im PBL 2025 bei 80 °C. Bei 70 °C wies es allerdings stark erhöhte Konzentrationen auf. Dieses Ergebnis stimmt mit den Daten des Temperaturvergleichs mit dem P2-Stamm überein (siehe **Kap. 3.3.2.1**). Im PBL 2025 $\Delta$ 3195 fand keine weitere Erhöhung von Pyruvat durch Einfluss der niedrigen Temperatur statt. Möglicherweise wird es zwar im nicht-phosphorylierenden ED-Weg stärker produziert, jedoch an anderer Stelle vermehrt weiterverstoffwechselt, beispielsweise im Zitronensäurezyklus. Diese Vermutung wird durch erhöhte Intermediate des TCA-Zyklus in der Mutante bei 70 °C bekräftigt (**Abb. 42**). Ein höherer Fluss durch den TCA-Zyklus deutet auf eine bessere Energiebilanz des Organismus hin, steht aber in diesem Fall im Gegensatz zum langsameren Wachstum bei 70 °C. Beim Temperaturvergleich mit dem P2-Stamm waren jedoch keine signifikanten Änderungen der Metabolitkonzentrationen im TCA-Zyklus zwischen 80 °C und 70 °C zu beobachten (**Kap 3.3.2.1**). Im Gegensatz dazu waren die Intermediate des TCA-Zyklus im PBL 2025 bei niedrigerer Temperatur herunterreguliert. Auffällig war eine stark verringerte Konzentration von Succinat im PBL 2025 bei 70 °C. Möglicherweise wurde dieser Metabolit als Vorstufe für andere Verbindungen benötigt und schneller umgesetzt als bei 80 °C. Entsprechende Zusammenhänge zwischen Metaboliten konnten an dieser Stelle jedoch nicht ergründet werden.

Bei den Metaboliten der Gluconeogenese, Glucose-6-phosphat und Fructose-6-phosphat, ließ sich ebenfalls der gleiche Effekt beobachten wie bei den Metaboliten des nicht-phosphorylierenden ED-Weges, allerdings nur im PBL 2025 $\Delta$ SSO3195 (**Abb. 41**). Die beiden Metabolite waren einerseits infolge der Mutation herunterreguliert, andererseits führte die niedrigere Temperatur zu einer weiteren Verringerung der Konzentration. Falls

eine Herunterregulierung bei 70 °C jedoch - wie beim Temperaturvergleich mit P2 angenommen - mit einem verringerten Durchfluss durch den semi-phosphorylierenden ED-Weg begründet werden könnte, stellt sich die Frage warum der Effekt sich in der Mutante verstärkt. Wenn aufgrund des *knock outs* über den katabolischen Weg kein Glyceraldehyd-3-phosphat gebildet werden kann, ändert sich das auch nicht bei 70 °C und somit müssten die Konzentrationen von Glucose-6-phosphat und Fructose-6-phosphat unverändert bleiben. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass womöglich bei 80 °C noch genügend GAP über den anabolischen Weg gebildet worden ist. Da dieser unterhalb des Temperaturoptimums vermutlich weniger aktiv ist, bzw. der Organismus aufgrund seiner schlechteren Energiebilanz ATP einspart, ist der Fluss durch die Gluconeogenese noch geringer als er es schon aufgrund der Mutation ist. Die zweite Vermutung ist, wie schon für den P2-Stamm bei 70 °C angenommen, ein erhöhter Umsatz von Fructose-6-phosphat und Glucose-6-phosphat aufgrund einer vermehrten Synthese von Sacchariden. Hochregulierte Konzentrationen mehrerer identifizierter Zucker untermauern diese Hypothese (**Kap. 3.3.5.3, Tab. 18**). Im PBL 2025 dagegen konnten keine signifikanten Änderungen der Konzentration von Glucose-6-phosphat und Fructose-6-phosphat bei 70 °C beobachtet werden. Da gleichzeitig fast alle Zucker herunterreguliert waren bzw. keine signifikanten Änderungen zeigten, wird die Hypothese, dass Glucose-6-phosphat und Fructose-6-phosphat in der Mutante aufgrund einer erhöhten Zuckersynthese herunterreguliert vorliegen, weiter bekräftigt.

Interessanterweise war Trehalose in der Mutante bei 70 °C erhöht, während Glucose um Faktor 8 erniedrigt war (**Abb. 41**). Das gleiche Verhalten konnte bereits im P2 1617 bei 70 °C beobachtet werden. Dieses Ergebnis bestärkt die Vermutung, dass Trehalose bei Temperaturen unterhalb des Optimums über die Trehalose glycosylübertragende Synthase (TreT) aus freier Glucose synthetisiert wird (siehe **Kap. 1.1.3, Abb. 4**). Im PBL 2025 verhielt sich die Trehalosekonzentration jedoch entgegengesetzt, indem sie bei 70 °C im Vergleich zu 80 °C herunterreguliert war. Gleichzeitig wies Glucose keine signifikanten Änderungen auf. Eine mögliche Erklärung wäre, dass dieses Phänomen mit der Deletion und den damit verbundenen hohen Konzentrationen von Disacchariden in PBL 2025 in Zusammenhang steht. Es wäre möglich, dass beispielsweise Lactose, die in großen Mengen akkumuliert wurde, ähnliche Schutzfunktionen in der Zelle einnimmt wie Trehalose. Im PBL2025ΔSSO3195 waren diese detektierten Disaccharide – inklusive

Trehalose, deren Abbau nicht von der Deletion betroffen ist - bei 80 °C (**Kap. 3.3.5.2**) wahrscheinlich infolge einer eingeschränkten Gluconeogenese aufgrund des *knock outs* im Vergleich zum PBL 2025 herunterreguliert. Bei 70 °C, und damit einer vermutlich weiter eingeschränkten Gluconeogenese, synthetisierte die Mutante vermehrt Trehalose aus Glucose. Der PBL 2025 hatte vermutlich aufgrund einer intakten Gluconeogenese ausreichend hohe Konzentrationen an Disacchariden, so dass er bei niedrigeren Temperaturen die Produktion nicht steigerte. Unklar ist, warum die Trehalosekonzentration sogar herunterreguliert war.

Interessant ist außerdem, dass Lactose sich sowohl im PBL 2025 als auch im PBL 2025 $\Delta$ SSO3195 ähnlich verhielt wie Trehalose (**Kap. 3.3.5.3, Tab. 18**). Während die Konzentration im PBL 2025 nicht signifikant verändert und sogar tendenziell erniedrigt war, kam Lactose im PBL2025 $\Delta$ SSO3195 zweifach hochreguliert bei 70 °C vor. Ein ähnliches Ergebnis konnte bereits im P2 1617 bei 70 °C beobachtet werden, wo Lactose um Faktor 6.01 erhöht war (**Kap. 3.3.2.1**). Dieses Ergebnis stützt die Hypothese, dass Lactose im Stoffwechsel ähnliche Funktionen wie Trehalose übernehmen könnte.

Einige weitere der im PBL 2025 und im PBL2025 $\Delta$ SSO3195 detektierten Metabolite verhielten sich bei 70 °C ebenso wie im P2 1617 bei 70 °C (siehe **Tab. 18**). Die Aminosäuren Lysin, Valin, Isoleucin und Prolin waren zum Teil stark hochreguliert. Die von 3-Phosphoglycerat ausgehenden Aminosäuren Glycin, Threonin und Serin waren dagegen etwas niedriger konzentriert bzw. wiesen keine Veränderungen bei 70 °C auf. Lediglich Homoserin war sowohl im PBL 2025 als auch in der Mutante hochreguliert. Dies könnte mit dem Vorkommen von Homoserin-lacton im Zusammenhang stehen, das in beiden Stämmen ausschließlich bei 70 °C detektiert worden ist. Interessanterweise war Aspartat im PBL 2025 herunter-, in der Mutante dagegen hochreguliert. Eine verringerte AMP-Konzentration deutete wie auch im P2-Stamm bei Temperaturen unterhalb des Optimums auf eine schlechtere Energiebilanz hin, was auch in Relation zu der langsameren Wachstumsrate stand. Weiterhin waren Galactosamin und Xylulose in beiden Organismen bei 70 °C hochreguliert, während 4-Hydroxyphenylacetat und Glycerol-3-phosphat herunterreguliert waren, wie auch im P2-Stamm.

Auffällig ist, dass einige Metabolite, die sich bei der niedrigeren Temperatur im PBL-Stamm ähnlich wie im P2 1617 verhielten, in der Mutante ein gegensätzliches Verhalten aufwiesen. 2-Hydroxyglutarat, Fructose, Inositol und Putrescin lagen im P2-Stamm und in

PBL 2025 in höheren Konzentrationen vor, waren in der Mutante jedoch herunterreguliert. Der einzige veränderte Metabolit aus dem Polyaminmetabolismus war neben Putrescin 5'-Methylthioadenosin, welcher in beiden Organismen bei 70 °C hochreguliert war und auf einen erhöhten Fluss durch den Polyaminstoffwechsel hinweisen könnte. Wie bereits beschrieben hat Putrescin mehrere Funktionen in der Zelle und ist an zahlreichen Stoffwechselwegen beteiligt. Daher ist es schwer zu sagen, warum es in der Mutante herunterreguliert war.

Auffällig ist weiterhin, dass der Zuckeralkohol Mannitol bzw. Sorbitol sowohl im PBL 2025 als auch in der Mutante ausschließlich bei 70 °C detektiert wurde. Zuckeralkohole sind - bis auf Inositol - bisher ausschließlich im P2-Stamm detektiert worden. Dies bestärkt die Vermutung, dass diese Verbindungen über eine spezielle Funktion im Stoffwechsel bei Temperaturen unter dem Optimum verfügen.

Zusammenfassend kann postuliert werden, dass der gezielte *knock out* des KDG-Kinase-Gens zwar eine starke Auswirkung auf den Zentralstoffwechsel hat, dem Organismus jedoch nicht bei seiner Energiebilanz und somit bei seinem Wachstum hindert. Dies untermauert nochmal das Vorhandensein von zwei parallelen Abbauwegen für Glucose bei *S. solfataricus*, den nicht-phosphorylierenden und den phosphorylierenden ED-Weg. Bei einer Herabsetzung der Kultivierungstemperatur auf 70 °C scheint die Mutante trotz der natürlichen Deletion und des gezielten *knock outs* über die gleichen Anpassungsstrategien wie der Wildtyp P2 1617 zu verfügen. Interessanterweise weicht das Verhalten des PBL-Stammes ohne *knock out* bei 70 °C stärker von diesem Anpassungsmuster ab. Dies könnte die Unterschiede zwischen den PBL 2025-Proben bei 70 °C und allen übrigen PBL-Proben, die bei der Hierarchischen Clusterung in **Abb. 39** deutlich wurden, erklären.

#### 4.3.6 Unbekannte Verbindungen

Bei ungerichteten *Metabolomics*-Anwendungen, d.h. wenn nicht nach gezielten *targets* sondern nach so vielen Metaboliten wie möglich gesucht wird (*untargeted*), besteht das GC-MS-Chromatogramm neben den identifizierten Metaboliten aus sehr vielen unbekannten Peaks. Die jeweiligen Massenspektren und die dazugehörigen Retentionsindices sind nicht in der verfügbaren Stoffbibliothek hinterlegt. Die meisten dieser Peaks

sind sehr klein und hauptsächlich Signale des Grundrauschens. Andere Peaks stellen Verunreinigungen oder Abspaltprodukte in unterschiedlichen Derivatisierungszuständen dar. Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten GC-MS-Analysen kamen relativ viele unbekannte Peaks jedoch in ausreichenden Intensitäten vor, wiesen ein gutes Massenspektrum auf und wurden wiederholt im Zellextrakt detektiert. Solche Peaks wurden nach dem jeweiligen Organismus benannt, nummeriert und die Informationen in die Stoffbibliothek aufgenommen. Einige der Verbindungen zeigten reproduzierbare biologische Unterschiede innerhalb der verschiedenen, im Rahmen dieser Arbeit analysierten Zustände. 15 unbekannte Verbindungen sollen hier diskutiert werden. Einige Massenspektren konnten anhand von Ähnlichkeiten zu bekannten Verbindungen und Derivatisierungsmustern bestimmten Stoffklassen und teilweise auch Metaboliten zugewiesen werden. Die ersten fünf unbekannten Verbindungen aus **Tab. 19** wurden ursprünglich in den mesophilen Bakterien *P. aeruginosa* bzw. *C. glutamicum* detektiert. Dennoch kamen sie auch in relativ hohen Konzentrationen im *S. solfataricus*-Zellextrakt vor. Alle 5 zeigten Unterschiede in ihrer Konzentration bei Temperaturen unter dem Optimum, z.B. waren Unknown-pae-065 und -066 bei 70 °C im Vergleich zur Optimaltemperatur (80 °C) hochreguliert, -065 auch bei 65 °C. Die beiden Stoffe Unknown-cgl-008 und -046 waren dagegen bei den kalten Temperaturen herunterreguliert. Unknown-pae-056 wies bei den kalten Temperaturen niedrigere Konzentrationen, nach einem einstündigen Hitzeschock bei 88 °C jedoch höhere Konzentrationen als bei 80 °C auf. Lediglich Unknown-pae-065 gibt Hinweise auf seine Struktur. Vergleiche mit anderen Stoffbibliotheken wie NIST und Golm lassen vermuten, dass es sich um ein Malat-Derivat handeln könnte. Unknown-pae-066 und cgl-008 verlassen die GC-Säule sehr früh, daher kann man davon ausgehen, dass es sich um vergleichsweise kleine Moleküle handelt. Interessant ist, dass die *Unknowns* pae-066 und cgl-046 bei einem Gesamtvergleich mehrerer Organismen ausschließlich in den beiden thermophilen Organismen *S. solfataricus* und *T. thermophilus* detektiert werden konnten. Es könnte sich hierbei um thermophilen-spezifische Verbindungen handeln. Insbesondere cgl-046 wäre als solch ein Metabolit vorstellbar, zumal er bei Temperaturen unterhalb des Optimums herunterreguliert ist. Alle weiteren *Unknowns* wurden in *S. solfataricus* detektiert, und zwar in allen drei bzw. einem oder zwei der im Rahmen dieser Arbeit analysierten Stämme. Unknown-P2-002 ist sehr wahrscheinlich ein hyperthermophilen- oder noch eher ein



archaeenspezifischer Metabolit, denn er wurde ausschließlich in *S. solfataricus* detektiert. Mit den Informationen der vorliegenden Massenspur und anderen Bibliotheken handelt es sich wahrscheinlich um einen Zuckeralkohol. Diese Vermutung wird durch die Tatsache gestützt, dass der Stoff bei niedrigeren Temperaturen hochreguliert und nach dem Hitzeschock herunterreguliert ist. Ebenso verhalten sich die anderen in *S. solfataricus* identifizierten Zuckeralkohole, wie Inositol und Erythritol.

Unknown-P2-009 wies ebenfalls höhere Konzentrationen bei 65 °C und 70 °C auf. Nach dem Hitzeschock konnte dieser Metabolit nicht mehr detektiert werden. Es scheint kein organismenspezifischer Stoff zu sein, denn er wurde z.B. auch in *C. glutamicum* und *P. putida* nachgewiesen. Bei dieser Verbindung könnte es sich nach einem Vergleich mit der Golmer Bibliothek um ein weiteres Malat-Derivat handeln. Unknown-P2-011 taucht wiederum lediglich im *S. solfataricus*-Extrakt auf und ist sowohl bei Hitze als auch bei Kälte herunterreguliert. Hierbei könnte es sich um eine organische Säure handeln. Mit einer Retentionszeit von 16 Minuten ist es sehr wahrscheinlich eine kleine Verbindung.

Unknown-P2-012 fällt ebenfalls durch eine verringerte Konzentration bei den kälteren Temperaturen auf. Das Massenspektrum und die sehr späte Retentionszeit weisen auf ein Disaccharid hin. Dieser Peak konnte in keinem anderen der untersuchten Organismen detektiert werden. Disaccharide konnten sowohl in *S. solfataricus* als auch in *T. thermophilus* in hohen Konzentrationen nachgewiesen werden (siehe **Kap. 4.3.1.2**). Die beiden Unbekannten P2-016 und P2-113 lassen sich sehr wahrscheinlich auf Verbindungen mit Amingruppen zurückführen. Hyperthermophile synthetisieren eine große Diversität an sog. Polyaminen (Friedman und Oshima, 1989, Oshima 2007). Diese haben wichtige Funktionen bei der Proteinbiosynthese und in der Stabilisierung von Molekülen. In *S. solfataricus* kommen neben großen Mengen Spermidin auch Spermin, Caldin und Thermin vor (Friedman und Oshima, 1989). Studien haben gezeigt, dass bei Temperaturen unterhalb des Optimums Triamine wie Spermidin und Caldin verstärkt auftreten, während bei höheren Temperaturen Tetraamine wie Spermin und Thermin gebildet werden. Caldin und Thermin wurden im Rahmen dieser Arbeit als Standards gemessen und in die Bibliothek eingefügt. Die Massenspektren der einzelnen Fragmente lassen sich jedoch kaum auseinanderhalten, weshalb eine eindeutige Zuweisung nicht möglich war. Es wäre möglich, dass es sich bei Unknown-P2-016 um ein Thermin- bzw. Spermin-Derivat handelt, da es bei den niedrigeren Temperaturen herunterreguliert war, während P2-113,

das nach dem Hitzeschock in niedrigeren Konzentrationen vorkam, ein Caldin-Derivat sein könnte (siehe **Abb. 27** bzw. **45**). Die beiden *Unknowns* wurden ausschließlich in *S. solfataricus*-Extrakten nachgewiesen, was die Hypothese der Polyamine bekräftigt.

Die letzten vier unbekannten Verbindungen wurden im PBL 2025 und im PBL 2025 $\Delta$ SSO3195 nachgewiesen, kamen zum Teil aber auch in niedrigerer Konzentration im P2-Stamm vor. Unknown-PBL-022 könnte laut Golmer Biobibliothek ein Tyrosin-Derivat sein. Unknown-PBL-025 weist eine sehr hohe Retentionszeit auf und das Massenspektrum hat Ähnlichkeiten mit AMP. Die Verbindung konnte ausschließlich im PBL 2025-Stamm nachgewiesen werden. Die *Unknowns* PBL-002, -005 und -022 kamen in der Mutante im Vergleich zu PBL 2025 signifikant erhöht vor. Es könnte sich dabei um Verbindungen handeln, die aufgrund des *knock outs* hochreguliert waren. Interessant ist außerdem, dass keiner dieser Stoffe in den mesophilen Organismen sowie *T. thermophilus* detektiert wurde.

## 5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nach bisherigem Wissensstand zum ersten Mal eine Metabolomanalyse des hyperthermophilen Archaeons *Sulfolobus solfataricus* durchgeführt und dabei wurden einige Anpassungen des Stoffwechsels bei Variationen der Temperatur festgestellt.

Zunächst war es notwendig, die Kultivierungsbedingungen und mikrobiologischen Parameter, wie spezifische Wachstumsrate, Konzentration der Biotrockenmasse und Verbrauch der Kohlenstoffquelle bei unterschiedlichen Kultivierungstemperaturen für den in der Arbeitsgruppe neuen Organismus zu ermitteln. Für eine verlässliche Metabolomanalyse wurde eine für mesophile Bakterien etablierte Aufarbeitungs- und Quenchingmethode an den hyperthermophilen Organismus angepasst. Außerdem wurde eine kontrollierte Kultivierung in einem Bioreaktor etabliert und ein *scale up* von 0.1 L auf 3 L erzielt. Mit der Aufgabe der zentralen Fermentationsstelle im Rahmen des SulfoSys-Projekts wurden die Zellen für alle Kooperationspartner kultiviert und dann verschickt.

Eine erste Analyse des metabolischen Profils ergab zahlreiche auffällige Unterschiede der relativen Metabolitkonzentrationen im Vergleich zu Mesophilen und/oder Bakterien. Einige der Differenzen, wie z.B. hohe Konzentrationen von Zuckeralkoholen, sind möglicherweise archaeenspezifisch, während hohe Polyaminkonzentrationen auf die Hyperthermophilie zurückgeführt werden könnten. Insgesamt konnten ca. 80 Metabolite des Primärstoffwechsels identifiziert werden.

In Zusammenarbeit mit Kooperationspartnern des SulfoSys-Projekt stand die Untersuchung des zentralen Kohlenhydratstoffwechsels von *S. solfataricus* bei Variationen der Temperatur im Vordergrund. Dabei konnte gezeigt werden, dass bei kontinuierlicher Kultivierung bei 70 °C und 65 °C Metabolite des in *S. solfataricus* vorkommenden nicht-phosphorylierenden katabolischen Zweigs des Entner-Doudoroff-Weges in höheren Konzentrationen vorkamen als bei Optimaltemperatur (80 °C). Dagegen waren Intermediate der Gluconeogenese herunterreguliert. Unklar ist, ob es sich dabei um verminderte Aktivitäten eines bzw. mehrerer Enzyme oder um eine spezielle Adaptation des Stoffwechsels handelt. Interessanterweise ergab die Analyse einer *knock out* Mutante, welcher die KDG-Kinase fehlt, ähnliche Veränderungen im zentralen Kohlenhydratstoffwechsel, die sich mit dem Einfluss einer niedrigeren Temperatur noch verstärkten.

Dies lässt vermuten, dass es sich tatsächlich um eine spezifische Anpassung der beiden parallelen ED-Wege handelt.

Anhand von Veränderungen von Metaboliten aus peripheren Stoffwechselwegen ließen sich ebenfalls Adaptationen an die niedrigeren Temperaturen erkennen, wie z.B. erhöhte Konzentrationen von Polyaminen und Zuckeralkoholen, die wahrscheinlich als Schutzmetabolite fungieren. Stark erhöhte Aminosäurekonzentrationen deuteten auf eine verstärkte Biosynthese von Proteinen hin, möglicherweise spezifische „Kälteschutz“-Proteine.

Mittels eines plötzlichen Kälteschocks von optimalen 80 °C auf 65 °C konnte gezeigt werden, dass der Organismus seinen Stoffwechsel innerhalb einer Generationszeit teilweise an die neue Umgebung anpasst, was beim Vergleich mit einer kontinuierlichen 65 °C-Kultur bestätigt werden konnte. Einige Metabolite bzw. Stoffwechselwege brauchen jedoch vermutlich länger, um das Niveau der kontinuierlichen Kultivierung zu erreichen.

Ein Hitzeschock von 80 °C auf 88 °C bewirkte nach einer Stunde keine großen Veränderungen. Festgestellt wurden lediglich erhöhte Aminosäurekonzentrationen, wahrscheinlich aufgrund zunehmender Synthese von Hitzeschock-Proteinen, sowie Veränderungen im Polyaminstoffwechsel, die auf die Synthese von längerkettigen Polyaminen als bei niedrigeren Temperaturen hindeuten könnte.

Für einige unbekannte Peaks im GC-MS-Chromatogramm von *S. solfataricus*, die nicht in der verwendeten Stoffbibliothek hinterlegt waren, konnte eine biologische *response* bei unterschiedlichen Temperaturen beobachtet werden. Durch Vergleiche von Massenspektren und Messungen von Standards konnten mehrere der Verbindungen bestimmten Stoffklassen zugewiesen werden, beispielsweise Polyaminen.

## 6 Ausblick

Im Hinblick auf die Erforschung von Regulationsmechanismen im zentralen Kohlenhydratstoffwechsel wäre es sinnvoll eine Methode zu finden, mit der es möglich ist, alle Metabolite - insbesondere die phosphorylierten Intermediate des semi-phosphorylierenden ED-Weges - zu identifizieren. Hier könnte ein *Metabolic profiling* angewendet werden, das ausschließlich auf diese wenigen Verbindungen abzielt, während alle weiteren Metabolite außer Acht gelassen werden könnten.

Zusätzliche interessante Einblicke zur physiologischen Bedeutung des verzweigten Entner-Doudoroff-Weges würden weitere Mutanten liefern, beispielsweise ein *knock out* des Enzyms GAPN oder der Glyceratkinase.

Weiterhin könnten die Temperaturschockexperimente variiert und die Kulturen nach dem Schock länger inkubiert werden, um auch eventuelle längerfristige Veränderungen im Metabolom ergründen zu können.

Die Strukturen der unbekannten Verbindungen sollten mithilfe dafür geeigneter Methoden, wie hochauflösender GC-MS, CI-Ionisierung und Isotopenmarkierungstechniken vollständig aufgeklärt werden. Zusätzlich sollten *Unknowns* näher untersucht werden, die in den hier durchgeführten Experimenten keine biologische *response* zeigten.

Als Ergänzung zur Analyse von kleinen Metaboliten wäre die Erfassung von Energieträgern und Koenzymen ein wichtiger Ansatz. Konzentrationsänderungen würden wichtige Informationen zur Energiebilanz des Organismus liefern. Diese größeren Metabolite könnten mittels der LC-MS-Technologie detektiert werden. LC-MS-Analysen wären außerdem zur Identifizierung anderer großer Metabolite, die mit GC-MS nicht detektierbar sind, von großer Bedeutung.

Zur kompletten Erfassung der Kohlenstoffbilanz sollte auf eine für den Organismus kompatible Messvorrichtung des Kohlenstoffs in der Abluft zurückgegriffen werden. Dies könnte z.B. mittels Gaschromatographie realisiert werden. Weiterhin sollte nach möglichen sekretierten C-haltigen Verbindungen im Zellüberstand von *S. solfataricus* - z.B. mit dafür optimierten HPLC-Methoden - geforscht werden.

## 7 Literaturverzeichnis

- Adams M.A., Chen Z., Landman P., Colmer T. D. (1999) Simultaneous determination by capillary gas chromatography of organic acids, sugars, and sugar alcohols in plant tissue extracts as their trimethylsilyl derivatives. *Anal Biochem*, **266**(1):77-84
- Ahmed H., Tjaden B., Hensel R., Siebers B. (2003) Embden-Meyerof-Parnas and Entner-Doudoroff pathways in *Thermoproteus tenax*: metabolic parallelism or specific adaptation? *Biochem Soc Trans*, **32**:2-4
- Ahmed H., Ettema T.J., Tjaden B., Geerling A.C., van der Oost J., Siebers B. (2005) The semi-phosphorylative Entner-Doudoroff pathway in hyperthermophilic archaea: a re-evaluation. *Biochem J*, **390**:529-540
- Albers S.V., Elferink M.G.L., Charlebois R.L., Sensen C.W., Driessen A.J.M., Koning W.N. (1999) Glucose Transport in the Extremely Thermoacidophilic *Sulfolobus solfataricus* Involves a High-Affinity Membrane-Integrated Binding Protein. *J Bacteriol*, **181**:4258-4291
- Albers S.V., Jonuscheit M., Dinkelaker S., Urich T., Kletzin A., Tampe R., Driessen A.J.M., Schleper C. (2006) Production of recombinant and tagged proteins in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Appl Environ Microbiol*, **72**(1):102-111
- Albers S.V., Driessen A.J.M. (2007) Conditions for gene disruption by homologous recombination of exogenous DNA into the *Sulfolobus solfataricus* genome *Archaea*, **2**:145-149
- Albers S.V., Birkeland N.K., Driessen A.J.M., Gertig S., Haferkamp P., Klenk H.P., Kouril T., Manica A., Pham T.K., Ruoff P., Schleper C., Schomburg D., Sharkey K.J., Siebers B., Sierocinski P., Steuer R., Van der Oost J., Westerhoff H.V., Wieloch P., Wright P.C., Zaparty M. (2009) Sulfosys (Sulfolobus Systems Biology): Towards a Silicon Cell Model for the Central Carbohydrate Metabolism of the Archaeon *Sulfolobus Solfataricus* under Temperature Variation. *Biochem Soc Trans*, **37**(1):58-64
- Allers T., Mevarech M. (2005) Archaeal genetics – the third way. *Nat Rev Gen*, **6**:58-73
- Barns S.M., Delwiche C.F., Palmer J.D., Pace N.R. (1996) Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *Proc Natl Acad Sci*, **93**:9188-9193
- Beckonert O., Keun H.C., Ebbels T.M.D., Bundy J., Holmes E., Lindon J.C., Nicholson J.K. (2007) Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat Protoc*, **2**:2692-2703

- Bennett B.D., Yuan J., Kimball E.H., Rabinowitz J.D. (2008) Absolute quantitation of intracellular metabolite concentrations by an isotope ratio-based approach. *Nat Protoc*, **3**(8):1299-1311
- Bertoldo C., Dock C., Antranikian G. (2004) Thermoacidophilic Microorganisms and their Novel Biocatalysts. *Eng Life Sci*, **4**(6):521-532
- Bolten C.J., Kiefer P., Letisse F., Portais JC, Wittmann C. (2007) Sampling for Metabolome Analysis of Microorganisms. *Anal Chem*, **79**(10):3843-3849
- Börner J., Buchinger S., Schomburg D. (2007) A high-throughput method for microbial metabolome analysis using gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Biochem*, **367**:143-151
- Brunner N.A., Brinkmann H., Siebers B., Hensel R. (1998) NAD<sup>+</sup>-dependent Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase from *Thermoproteus tenax*. *J Biol Chem*, **273**(11):6149-6156
- Buchanan C.L., Connaris H., Danson M.J., Reeve C.D., Hough D.W. (1999) An extremely thermostable aldolase from *Sulfolobus solfataricus* with specificity for non-phosphorylated substrates. *Biochem J*, **343**:563-570
- Buchholz A., Hurlebaus J., Wandrey C., Takors R. (2002) Metabolomics: quantification of intracellular metabolite dynamics. *Biomol Eng*, **19**:5-15
- Cacciapuoti G., Porcelli M., Bertoldo C., De Rosa M., Zappia V. (1994) Purification and Characterization of Extremely Thermophilic and Thermostable 5'-Methylthioadenosine Phosphorylase from the Archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J Biol Chem*, **269**(40):24762-24769
- Charlier D., Droogmans L., (2005) Microbial Life at high temperature, the challenges, the strategies. *Cell Mol Life Sci*, **62**:2974-2984
- Chen L., Spiliotis E.T., Roberts M.F. (1998) Biosynthesis of Di-*myo*-Inositol-1,1'-Phosphate, a Novel Osmolyte in Hyperthermophilic Archaea. *J Bacteriol*, **180**(15):3785-3792
- Chmiel H., Bioprozesstechnik, Spektrum Akademischer Verlag, München 2005
- Chong P.K., Wright P.C. (2005) Identification and Characterization of the *Sulfolobus solfataricus* P2 Proteome. *J Proteome res*, **4**:1789-1798
- Chong P.K., Burja A.M., Radianingtyas H., Fazeli A., Wright P.C. (2006) Proteome Analysis of *Sulfolobus solfataricus* P2 Propanol Metabolism. *J Proteome res*, **6**:1430-1439

- Chong P.K., Burja A.M., Radianingtyas H, Fazeli A, Wright P.C. (2007) Translational and transcriptional analysis of *Sulfolobus solfataricus* P2 to provide insights into alcohol and ketone utilisation. *Proteomics*, **7**:424-435
- Czermak P., Weber C., Nehring D. (2005) A ceramic microsparging aeration system for cell culture reactors. *Publication Series of IBPT-University of Applied Sciences Giessen-Friedberg*, **1**:1-6
- da Costa M.S., Santos H., Galinski E.A. (1998) An overview of the role and diversity of compatible solutes in *Bacteria* and *Archaea*. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, **61**:117-153
- Daniel R.M., Cowan D.A. (2000) Biomolecular stability and life at high temperatures. *Cell Mol Life Sci*, **57**:250-264
- de Koning W., van Dam K. (1992) A Method for the Determination of Changes of Glycolytic Metabolites in Yeast on a Subsecond Time Scale Using Extraction at Neutral pH. *Anal Biochem*, **204**:118-123
- De Rosa M., Gambacorta A., Nicolaus B., Giardina P., Poerio E. and Buonocore V. (1984) Glucose metabolism in the extreme thermoacidophilic archaebacterium *Sulfolobus solfataricus*. *Biochem. J*, **224**:407-414
- DeRisi J., Penland L., Brown P.O., Bittner M.L., Meltzer P.S., Ray M., Chen Y., Su Y.A. Trent J.M. (1996) Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat genetics*, **14**:457-460
- Dunn W.B., Bailey N.J.C., Johnson H.E. (2005) Measuring the metabolome: current analytical technologies. *Analyst*, **130**:606-625
- Elfenrink M.G.L., Albers S.V., Konings W.N., Driessen A.J.M. (2001) Sugar transport in *Sulfolobus solfataricus* is mediated by two families of binding protein-dependent ABC transporters. *Mol Microbiol*, **39(6)**:1494-1503
- Ettema T.J.G, Ahmed H., Geerling A.C.M., van der Oost J., Siebers B. (2008) The non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPN) of *Sulfolobus solfataricus*: a key-enzyme of the semi-phosphorylative branch of the Entner-Doudoroff pathway. *Extremophiles*, **12**:75-88
- Feng X., Liu X., Luo Q., Liu BF. (2008) Mass spectrometry in systems biology: An overview. *Mass Spectrom Rev*, **27(6)**:635-660
- Fiehn O., Kopka J., Dörmann P., Altmann T., Trethewey R.N., Willmitzer L. (2000) Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nat Biotechnol*, **18**:1157-1161
- Fiehn O., Kloska S., Altmann T. (2001) Integrated studies on plant biology using multiparallel techniques. *Curr Opin Biotechnol*, **12**:82-86



- Fiehn, O. (2002) Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol*, **48**:155-171
- Friedman S.M., Oshima T. (1989) Polyamines of Sulfur-Dependent Archaeobacteria and Their Role in Protein Synthesis. *J Biochem*, **105**:1030-1033
- Frimmersdorf E. (2010), Metabolomanalyse von *Corynebacterium glutamicum* und *Pseudomonas aeruginosa* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen. Dissertation, Braunschweig
- Frimmersdorf E., Horatzek S., Pelnikevich A., Wiehlmann L., Schomburg D. (2010) How *Pseudomonas aeruginosa* adapts to various environments: a metabolomic approach. *Environ Microbiol*, **12**(6):1734-1747
- Gabriel J.L., Chong P.L.G. (2000) Molecular modeling of archaeobacterial bipolar tetraether lipid membranes. *Chem phys lip*, **105**:193-200
- Galtier N., Lobry J.R. (1997) Relationships between genomic G+C content, RNA secondary structures and optimal growth temperature in prokaryotes. *J. Mol. Evol.* **44**: 632–636
- Graham R.L.J., Graham C., McMullan G. (2007) Microbial proteomics: a mass spectrometry primer for biologists. *Microbiol Cell Fac*, **6**(26):2-14
- Grogan D.W. (1989) Phenotypic Characterisation of the Archaeobacterial Genus *Sulfolobus*: Comparison of Five Wild-Type Strains. *J Bacteriol*, **171**(12):6710-6719
- Haseltine C., Montalvo-Rodriguez R., Carl A., Bini E., Blum P. (1999) Extragenic Pleiotropic Mutations That Repress Glycosyl Hydrolase Expression in the Hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Genetics*, **152**:1353-1361
- Higashibata H., Fujiwara S., Ezaki S., Takagi M., Fukui K., Imanaka T. (2000) Effect of Polyamines on Histone-Induced DNA Compaction of Hyperthermophilic Archaea. *J Biosci Bioeng*, **89**(1):103-106
- Hiller K., Hangebrauk J., Jäger C., Spura J., Schreiber K., Schomburg D. (2009) MetaboliteDetector: Comprehensive Analysis Tool for Targeted and Nontargeted GC/MS Based Metabolome Analysis. *Anal Chem*, **81**:3429-3439
- Hjort K., Bernander R. (1999) Changes in Cell Size and DNA Content in *Sulfolobus* Cultures during Dilution and Temperature Shift Experiments. *J Bacteriol*, **81**(18):5669-5675
- Holst O., Manelius Å., Krahe M., Märkl H., Raven N., Sharp R. (1997) Thermophiles and Fermentation Technology. *Comp Biochem Physiol*, **118A**(3):415-422
- Hostettmann K., Wolfender J.L. (1997) The Search for Biologically Active Secondary Metabolites. *Pestic Sci*, **51**:471-482

- Huber H., Hohn M.J., Rachel R., Fuchs T., Wimmer V.C., Stetter K.O. (2002) A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature*, **417**,63-67
- Johnson M.R., Montero C.I., Connors S.B., Shockley K.R., Bridger S.L., Kelly R.M. (2005) Population density-dependent regulation of exopolysaccharide formation in the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Mol. Microbiol*, **55**:664–674
- Kan E.S., Park C.B., Lee S.B. (1997) Optimization of culture conditions for hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Kor J Biotechnol Bioeng*, **12**, 121-126
- Kim S., Lee S.B. (2005) Identification and characterization of *Sulfolobus solfataricus* D-gluconate dehydratase: a key enzyme in the non-phosphorylated Entner–Doudoroff pathway. *Biochem J*, **387**:271–280
- Kim S., Lee S.B. (2006) Characterisation of *Sulfolobus solfataricus* 2-Keto-3-deoxy-D-gluconate Kinase in the Modified Entner Doudoroff Pathway. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70(6)**:1308.1316
- Kimball E., Rabinowitz J.D. (2006) Identifying decomposition products in extracts of cellular metabolites. *Anal Biochem*, **358(2)**:273-280
- König H., Skorko R., Zillig W., Reiter WD (1982) Glycogen in Thermoacidophilic Archaeobacteria of the Genera *Sulfolobus*, *Thermoproteus*, *Desulfurococcus* and *Thermococcus*. *Arch Microbiol*, **132**:297-303
- Kopka J., Fernie A., Weckwerth W., Gibon Y., Stitt M. (2004) Metabolite profiling in plant biology: platforms and destinations. *Gen Biol*, **5(109)**
- Kouril T., Zaparty M., Marrero J., Brinkmann H., Siebers B. (2008) A novel trehalose synthesizing pathway in the hyperthermophilic Crenarchaeon *Thermoproteus tenax*: the unidirectional TreT pathway. *Arch Microbiol*, **190**:355-369
- Kováts E. (1965) Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. *Adv Chromatogr*, **1**:229-47
- Krahe M., Antranikian G., Märkl H. (1996) Fermentation of extremophilic microorganisms. *FEMS Microbiol Rev*, **18**:271-285
- Kudrewitzki F. (1984) Zur Maßstabsübertragung von aeroben mikrobiologischen Prozessen. Teil I. Stofftransport. *Acta Biotechnol*, **2**:89-104
- Laksanalami P., Robb F.T. (2004) Small heat shock proteins from extremophiles: a review. *Extremophiles*, **8**:1-11

- Lamble H.J., Heyer N.I., Bull S.D., Hough D.W., Danson M.J. (2003) Metabolic Pathway Promiscuity in the Archaeon *Sulfolobus solfataricus* Revealed by Studies on Glucose Dehydrogenase and 2-Keto-3-deoxygluconate Aldolase. *J Biol Chem*, **278**(36):34066-34072
- Lamble H.J., Theodossis A., Milburn C.C., Taylor G.L., Bull S.D., Hough D.W., Danson M.J. (2005) Promiscuity in the part-phosphorylative Entner-Doudoroff pathway of the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *FEBS Lett*, **579**:6865-6869
- Langworthy T.A., Mayberry W.R., Smith P.F. (1974) Long-Chain Glycerol Diether and Polyol Dialkyl Glycerol Triether Lipids of *Sulfolobus acidocaldarius*. *J Bacteriol*, **119**(1):106-116
- Loret M.O., Pedersen L., Francois J. (2007) Revised procedures for yeast metabolites extraction: application to a glucose pulse to carbon-limited yeast cultures, which reveals a transient activation of the purine salvage pathway. *Yeast*, **24**:47-60
- Maaty W.S., Wiedenheft B., Tarlykov P., Schaff N., Heinemann J., Robison-Cox J., Valenzuela J., Dougherty A., Blum P., Lawrence C.M., Douglas T., Young M.J., Bothner B. (2009) Something Old, Something New, Something Borrowed; How the Thermoacidophilic Archaeon *Sulfolobus solfataricus* Responds to Oxidative Stress. *Plos One*, **4**(9):1-17
- Madigan M.T., Martinko J.M., Dunlap P., Clark D.P., Brock T.D. (2009): Brock biology of microorganisms. San Francisco, Calif., Pearson/Benjamin Cummings.
- Martins L.O., Huber R., Huber H., Stetter K.O., Da Costa M.S., Santos H. (1997) Organic Solutes in Hyperthermophilic *Archaea*. *App Environ Microbiol*, **63**(3):896-902
- Martusewitsch E. (2004) Differentielle Genexpression in dem hyperthermophilen Archaeon *Sulfolobus solfataricus* nach Hitzeschock. Dissertation, Darmstadt
- Maruta K., Mitsuzumi H., Nakada T., Kubota M., Chaen H., Fukuda S., Sugimoto T., Kurimoto M. (1996) Cloning and sequencing of a cluster of genes encoding novel enzymes of trehalose biosynthesis from the thermophilic archaebacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biochim Biophys Acta*, **1291**:177-181
- Mashego M.R., van Gulik W.M., Vinke J.L., Heijnen J.J. (2003) Critical Evaluation of Sampling Techniques for Residual Glucose Determination in Carbon-Limited Chemostat Culture of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng*, **83**(4):395-399
- Mashego M.R., Rumbold K., De Mey M., Vandamme E., Soetaert W., Heijnen J.J. (2007) Microbial metabolomics: past, present and future methodologies. *Biotechnol Lett*, **29**:1-16
- Mönch-Tegeder (2010) Metabolomanalyse von *Sulfolobus solfataricus* unter verschiedenen Bedingungen. Bachelorarbeit, Braunschweig

- Monton M.R.N., Soga T. (2007) Metabolome analysis by capillary electrophoresis–mass spectrometry. *J Chromatogr A*, **1168**:237-246
- Ng F.S.W., Wright D.M., Seah S.Y.K. (2011) Characterization of a Phosphotriesterase-Like Lactonase from *Sulfolobus solfataricus* and Its Immobilization for Disruption of Quorum Sensing. *App Environ Microbiol*, **77**(4):1181-1186
- Nicolaus B., Trincone A., Esposito E., Vaccaro M.R., Gambacorta A., De Rosa M. (1990) Calditol tetraether lipids of the archaebacterium *Sulfolobus solfataricus*. *Biochem J*, **266**:785-791
- Nicolaus B., Manca M.C., Romano I., Lama L. (1993) Production of an exopolysaccharide from two thermophilic archaea belonging to the genus *Sulfolobus*. *FEMS Microbiol Lett*, **109**:203-206
- Nicolaus B., Kambourova M., Oner E.T., (2010) Exopolysaccharides from extremophiles: from fundamentals to biotechnology. *Environ Technol*, **31**(10):1145-1158
- Nielsen J., Oliver S. (2005) The next wave in metabolome analysis. *TRENDS Biotechnol*, **23**(11):544-546
- Nielsen J., Villadsen J. (1994) Elemental Composition of Biomass. *Bioreac Eng Prin*, 1. Edition, Plenum Press, 2:42-46, New York 38
- Noon K.R., Bruenger E. and McCloskey J.A. (1998) Posttranscriptional modifications in 16S and 23S rRNAs of the archaeal hyperthermophile *Sulfolobus solfataricus*. *J Bacteriol*, **180**:2883–2888
- Nunn C.E.M., Johnsen U., Schönheit P., Fuhrer T., Sauer U., Hough D.W., Danson M.J. (2010) Metabolism of Pentose Sugars in the Hyperthermophilic Archaea *Sulfolobus solfataricus* and *Sulfolobus acidocaldarius*. *J Biol Chem*, **285**(44):33701-33709
- O'Farrell, P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*, **250**:4007-4021
- Oshima T., (2007) Unique polyamines produced by an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. *Amino Acids*, **33**:367-372
- Oshima T., Moriya T., Terui Y. (2011) Identification, Chemical Synthesis, and Biological Functions of Unusual Polyamines Produced by Extreme Thermophiles. *Met Mol Biol*, **720**(2) 81-111
- Paggi R.A., Martone C.B., Fuqua C., De Castro R.E. (2003) Detection of quorum sensing signals in the haloalkaliphilic archaeon *Natronococcus occultus*. *FEMS Microbiol Lett*, **221**:49-52

- Park C.B., Lee S.B., (1998) Ammonia Production from Yeast Extract and Its Effect on Growth of the Hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Biotechnol Bioprocess Eng*, **3**:115-118
- Park C.B., Lee S.B., (1999) Inhibitory Effect of Mineral Ion Accumulation on High Density Growth of the Hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J Biosci Bioeng*, **87(3)**:315-319
- Raina A., Cohen S.S. (1966) Polyamines and RNA synthesis in a polyauxotrophic strain of *E.coli*. *Biochem*, **55**:1587-1593
- Rinker K.D., Han C.J., Kelly R.M. (1999) Continuous culture as a tool for investigating the growth physiology of heterotrophic hyperthermophiles and extreme thermoacidophiles. *J Appl Microbiol Symp Suppl*, **85**:118S-127S
- Robb F., Antranikian G., Grogan D., Driessen A. (2008) Thermophiles: Biology and Technology at High Temperatures, *Crc Pr Inc Verlag*, 1. Auflage
- Roberts M. (2006) Inositol in Bacteria and Archaea. *Subcell Biochem*, **39**:103-133
- Schäfer U., Boos W., Takors R., Weuster-Botz D. (1999) Automated Sampling Device for Monitoring Intracellular Metabolite Dynamics. *Anal Biochem*, **270**:88-96
- Schena M., Shalon D., Davis R.W., Brown P.O. (1995) Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray. *Science*, **270**:467-470
- Schenk P.M., Kazan K., Wilson I., Anderson J.P., Richmond T., Somerville S.C., Manners J.M. (2000) Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *PNAS*, **97(21)**:11655-11660
- Schiraldi C., Marulli F., Di Lernia I., Martino A., De Rosa M. (1999) A microfiltration bioreactor to achieve high cell density in *Sulfolobus solfataricus* fermentation. *Extremophiles*, **3**:199-204
- Schiraldi C., De Rosa M. (2002) The production of biocatalysts and biomolecules from extremophiles. *TRENDS Biotechnol*, **20(12)**:515-521
- Schneider J., Wendisch V.F. (2011) Biotechnological production of polyamines by Bacteria: recent achievements and future perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*, **91(1)**:17-30
- Schönheit P., Schäfer T., (1995) Metabolism of hyperthermophiles. *World J Microbiol Biotechnol*, **11**:26-57
- Selig M., Xavier K.B., Santos H., Schönheit P. (1997) Comparative analysis of Embden-Meyerof and Entner-Doudoroff glycolytic pathways in hyperthermophilic archaea and the bacterium *Thermotoga*. *Arch Microbiol*, **167**:217-232

- She Q., Singh R.K., Confalonieri F., Zivanovic Y., Allard G., Awayez M.J., Chan-Weiher C.C.Y., Groth Clausen I., Curtis B-A., De Moors A., Erauso G., Fletcher C., Gordon P.M.K., Heikamp-de Jong I., Jeffries A.C., Kozera C.J., Medina N., Peng X., Thi-Ngoc H.P., Redder P., Schenk M.E., Theriault C., Tolstrup N., Charlebois R.L., Doolittle W.F., Duguet M., Gaasterland T., Garrett R.A., Ragan M.A., Sensen C.W., van der Oost J. (2001) The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. *PNAS*, **98**(14):7835–7840
- Shevchenko A., Loboda A., Shevchenko A., Ens W., Standing K.G. (2000) MALDI Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry: A Powerful Tool for Proteomic Research. *Anal Chem*, **72**:2132-2141
- Shockcor J.P., Unger S.E., Wilson I.D., Foxall P.J.D., Nicholson J.K., Lindon J.C. (1996) Combined HPLC, NMR Spectroscopy, and Ion-Trap Mass Spectrometry with Application to the Detection and Characterization of Xenobiotic and Endogenous Metabolites in Human Urine. *Anal Chem*, **68**:4431-4435
- Siebers B., Tjaden B., Michalke K., Dörr C., Ahmed H., Zaparty M., Gordon P., Sensen C., Zibat A., Klenk H.P., Schuster S.C. and Hensel R. (2004) Reconstruction of the central carbohydrate metabolism of *Thermoproteus tenax* by use of genomic and biochemical data. *J Bacteriol*, **186**:2179-2194
- Siebers B., Schönheit P. (2005) Unusual pathways and enzymes of central carbohydrate metabolism in Archaea. *Curr Opin Microbiol*, **8**:695-705
- Siebers B. (2009) Hot Design: The Central Carbohydrate Metabolism of *Sulfolobus solfataricus*. Präsentation, *SysMO Conference*, Wien
- Simon G., Walther J., Zabeti N., Combet-Blanc Y., Auria R., van der Oost J., Casalot L. (2009) Effect of O<sub>2</sub> concentrations on *Sulfolobus solfataricus* P2. *FEMS Microbiol Lett*, **299**:255-260
- Snijders A.P.L., Walther J., Peter S., Kinnman I., de Vos M.G.J., van de Werken H.J.G., Brouns S.J.J., van der Oost J., Wright P.C. (2006) Reconstruction of central carbon metabolism in *Sulfolobus solfataricus* using a two-dimensional gel electrophoresis map, stable isotope labelling and DNA microarray analysis. *Proteomics*, **6**(15):1518–1529
- Soderberg T. (2005) Biosynthesis of ribose-5-phosphate and erythrose-4-phosphate in archaea: a phylogenetic analysis of archaeal genomes. *Archaea*, **1**:347-352
- Soga T., Ohashi Y., Ueno Y., Naraoka H., Tomita M., Nishioka T. (2003) Quantitative Metabolome Analysis Using Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry. *J Proteome Res*, **2**(5):488-494

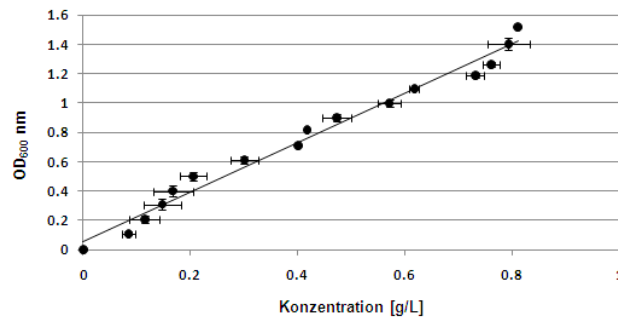
- Spura J., Reimer L.C., Wieloch P., Schreiber K., Buchinger S., Schomburg D. (2009) A method for enzyme quenching in microbial metabolome analysis successfully applied to gram-positive and gram-negative bacteria and yeast. *Anal Biochem*, **394**:192-201
- Strelkov S., von Elstermann M., Schomburg D. (2004) Comprehensive analysis of metabolites in *Corynebacterium glutamicum* by gas chromatography/mass spectrometry. *Biol Chem*, **385**:853-861
- Tachdjian S., Kelly R.M. (2006) Dynamic Metabolic Adjustments and Genome Plasticity Are Implicated in the Heat Shock Response of the Extremely Thermoacidophilic Archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J Bacteriol*, **181**(12):4553-4559
- Takai K., Nakamura K., Toki T., Tsunogai U., Miyazaki M., Miyazaki J., Hirayama H., Nakagawa S., Nunoura T. und Horikoshi K. (2008) Cell proliferation at 122 °C and isotopically heavy CH<sub>4</sub> production by a hyperthermophilic methanogen under high pressure cultivation. *PNAS*, **105**(31):10949-10954
- Terui Y., Ohnuma M., Hiraga K., Kawashima E., Oshima T. (2005) Stabilization of nucleic acids by unusual polyamines produced by an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. *Biochem J*, **388**:427-433
- Tolstikov V.V., Fiehn O. (2002) Analysis of Highly Polar Compounds of Plant Origin: Combination of Hydrophilic Interaction Chromatography and Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry. *Anal Biochem*, **301**:298-307
- Tolstikov V.V., Fiehn O., Tanaka N. (2007) Application of liquid chromatography-mass spectrometry analysis in metabolomics: reversed-phase monolithic capillary chromatography and hydrophilic chromatography coupled to electrospray ionization-mass spectrometry. *Methods Mol Biol*, **358**:141-155
- Tomlinson G.A., Koch T.K., Hochstein L.I. (1974) The metabolism of carbohydrates by extremely halophilic bacteria: glucose metabolism via a modified Entner-Doudoroff pathway. *Can J Microbiol*, **20**(8):1085-1091
- Trauger S.A., Kalisak E., Kalisiak J., Morita H., Weinberg M.V., Menon A.L., Il F.L.P., Adams M.W.W., Siuzdak G. (2008) Correlating the Transcriptome, Proteome, and Metabolome in the Environmental Adaptation of a Hyperthermophile. *J Prot res*, **7**:1027-1035
- van der Oost J., Schut G., Kengen S.W.M., Hagen W.R., Thomm M., de Vos W.M. (1998) The ferredoxin-dependent conversion of glyceraldehyde-3-phosphate in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* represents a novel site of glycolytic regulation. *J Biol Chem*, **273**:28149– 28154
- van der Oost J., Siebers B. (2007) The glycolytic pathways of Archaea: evolution by tinkering. In: Garrett RA, Klenk H-P (eds) *Archaea: evolution, physiology and molecular biology*, **22**:247–260, Blackwell, Malden

- Veith A., Klingl A., Zolghadr B., Lauber K., Mentele R., Lottspeich F., Rachel R., Albers S.V., Kletzin A. (2009) Acidianus, Sulfolobus and Metallosphaera surface layers: structure, composition and gene expression. *Mol Microbiol*, **73**(1):8-72
- Verhees C.H., Kengen S.W., Tuininga J.E., Schut G.J., Adams M.W.W., De Vos W.M., van der Oost J (2003) The unique features of glycolytic pathways in Archaea. *Biochem J*, **375**:231–246
- Villas-Bôas S.G., Mas S., Åkesson M., Smedsgaard J., Nielsen J. (2005) Mass Spectrometry in Metabolome Analysis. *Mass Spectrom Rev*, **24**:613-646
- Villas-Bôas S.G., Højer-Pedersen J., Åkesson M., Smedsgaard J., Nielsen J. (2005a) Global metabolite analysis of yeast: evaluation of sample preparation methods. *Yeast*, **22**:1155-1169
- Villas-Bôas S.G., Roessner U., Hansen M.A.E., Smedsgaard J., Nielsen J. (2007) Metabolome Analysis: An introduction. *Wiley*, ISBN: 978-0-471-74344-6
- Weckwerth, W. (2003) Metabolomics in Systems Biology. *Annu Rev Plant Biol*, **54**:669-689
- Weinberg M.V., Schut G.J., Brehm S., Datta S., Adams M.W. (2005) Cold shock of a hyperthermophilic archaeon: *Pyrococcus furiosus* exhibits multiple responses to a suboptimal growth temperature with a key role for membrane-bound glycoproteins. *J Bacteriol*, **187**(1):336–348
- Wendisch V.F., Bott M., Kilanowski J., Oldiges M., Wiechert W. (2006) Emerging Corynebacterium glutamicum systems biology. *J Biotechnol*, **124**:74-92
- Weuster-Botz D. (1997) Sampling tube device for monitoring intracellular metabolite dynamics. *Anal Biochem*, **246**:225–233
- Wittmann C., Kromer J.O., Kiefer P., Binz T., Heinzle E. (2004) Impact of the cold shock phenomenon on quantification of intracellular metabolites in bacteria. *Anal Biochem*, **327**:135-139
- Woese C.R., Fox G.E. (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci, USA* **74**:5088-5090
- Woese C.R., Kandler O. and Wheelis M.L. (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**:4576-4579
- Wortham B., Oliveira M., Patel C. (2007) Polyamines in Bacteria: Pleiotropic Effects yet Specific Mechanisms. *Adv Exp Med Biol*, **603**(2):106-115

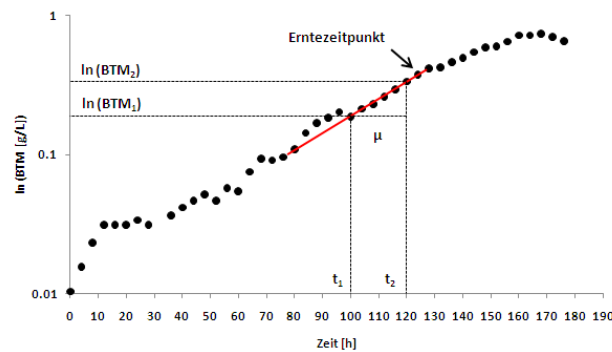


- Worthington P., Hoang V., Perez-Pomares F., Blum P. (2003) Targeted disruption of the alpha-amylase gene in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J Bacteriol*, **185**:482–488
- Zaparty M., Esser D., Gertig S., Haferkamp P., Kouril T., Manica A., Pham T.K., Reimann J., Schreiber K., Sierocinski P., Teichmann D., van Wolferen M., van Jan M., Wieloch P., Albers S.V., Driessen A.J.M., Klenk H.P., Schleper C., Schomburg D., van der Oost J., Wright P.C., Siebers B. (2009) „Hot standards“ for the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Extremophiles*, **14(1)**:119-142
- Zhang W., Li F., Nie L. (2010) Integrating multiple ‘omics’ analysis for microbial biology: application and methodologies. *Microbiol*, **156**:287-301
- Zillig W., Stetter K.O., Wunderl S., Schulz W., Priess H., Scholz I. (1980) The *Sulfolobus*-”Caldariella” Group: taxonomy on the basis of the structure of DNA-dependent RNA polymerases. *Arch Microbiol*, **125**:259–269

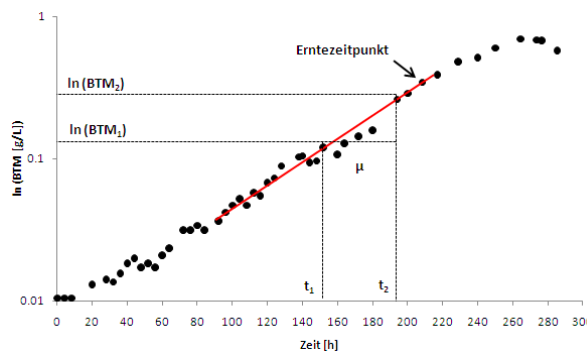
## 8 Anhang



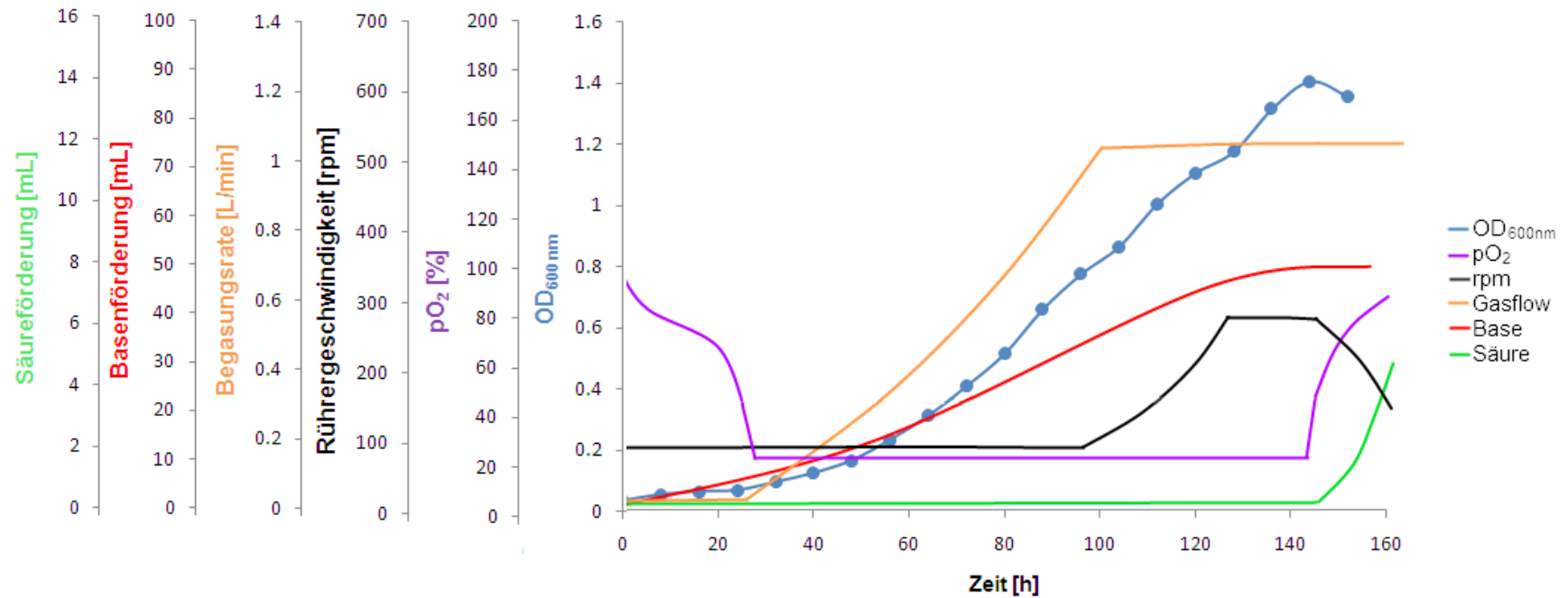
**Abb. 46** Korrelation zwischen der Biotrockenmasse und optischer Dichte. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Versuchsreihen.



**Abb. 47** Graphische Ermittlung der exponentiellen Wachstumsphase (Regressionsgerade) und der spezifischen Wachstumsrate  $\mu$  bei 70 °C. Der Pfeil stellt den Erntezeitpunkt für die Metabolomanalyse dar.



**Abb. 48** Graphische Ermittlung der exponentiellen Wachstumsphase (Regressionsgerade) und der spezifischen Wachstumsrate  $\mu$  bei 65 °C. Der Pfeil stellt den Erntezeitpunkt für die Metabolomanalyse dar.



**Abb. 49** Fermentationsverlauf von *S. solfataricus* bei 80 °C vom Animpfen der Kultur bis zur Ernte der Zellen nach 100 h. Dargestellt sind die Parameter OD<sub>600 nm</sub>, pO<sub>2</sub>-Wert, Rührergeschwindigkeit (rpm), Begasungsrate (Gasflow), Basen- und Säureförderung.

**Tab. 20** Kohlenstoffanteile in der Biotrockenmasse und Glucose bei einer 80 °C-Kultivierung.

Zeit [h]	OD <sub>600</sub>	BTM [g/L]	BTM [g]	C [BTM]	Glucose [g/L]	Glucose [g]	C [Glucose]
0	0.04	0.02	0.07	0.03	4.00	12.00	4.80
62	0.34	0.18	0.54	0.26	3.30	9.90	3.96
65	0.39	0.21	0.62	0.29	3.20	9.60	3.84
69	0.45	0.23	0.70	0.33	3.15	9.45	3.78
73	0.52	0.27	0.81	0.39	3.08	9.24	3.69
77	0.65	0.34	1.02	0.49	2.80	8.40	3.36
85	0.74	0.39	1.16	0.55	2.40	7.20	2.88
89	0.80	0.42	1.25	0.60	2.28	6.84	2.73
93	0.86	0.45	1.34	0.64	2.26	6.78	2.71
97	0.89	0.46	1.39	0.67	2.03	6.09	2.43
101	0.95	0.49	1.48	0.71	1.93	5.79	2.31
109	1.04	0.54	1.63	0.78	1.77	5.31	2.12
113	1.10	0.57	1.72	0.82	1.55	4.65	1.86
117	1.15	0.60	1.80	0.86	1.58	4.74	1.89
121	1.17	0.61	1.83	0.88	1.28	3.84	1.53
125	1.26	0.65	1.96	0.94	1.12	3.36	1.34
133	1.31	0.68	2.05	0.98	0.80	2.40	0.96
137	1.40	0.73	2.19	1.05	0.60	1.80	0.72
141	1.41	0.73	2.20	1.05	0.51	1.53	0.61

**Tab. 21** Kohlenstoffanteile in der Biotrockenmasse und Glucose bei einer 70 °C-Kultivierung.

Zeit [h]	OD <sub>600</sub>	BTM [g/L]	BTM [g]	C [BTM]	Glucose [g/L]	Glucose [g]	C [Glucose]
0	0.03	0.02	0.05	0.03	4.00	12.00	4.80
68	0.30	0.15	0.46	0.22	3.30	9.90	3.96
72	0.33	0.17	0.52	0.25	3.18	9.54	3.81
76	0.39	0.20	0.60	0.29	3.13	9.39	3.75
92	0.58	0.30	0.91	0.43	2.60	7.80	3.12
96	0.63	0.33	0.98	0.47	2.40	7.20	2.88
100	0.71	0.37	1.11	0.53	2.26	6.78	2.71
117	0.90	0.47	1.41	0.67	1.90	5.70	2.28

Zeit [h]	OD <sub>600</sub>	BTM [g/L]	BTM [g]	C [BTM]	Glucose [g/L]	Glucose [g]	C [Glucose]
120	0.94	0.49	1.47	0.70	1.84	5.52	2.21
123	0.96	0.50	1.50	0.72	1.55	4.65	1.86
140	1.14	0.59	1.78	0.85	1.14	3.42	1.37
144	1.18	0.61	1.84	0.88	0.91	2.73	1.09
148	1.25	0.65	1.95	0.94	0.64	1.92	0.77
169	1.41	0.73	2.20	1.05	0	0	0

**Tab. 22** Übersicht über alle identifizierten Metabolite in Zellextrakten von *S. solfataricus* und die mittleren Peakflächen, Standardfehler und relative Standardfehler.

Metabolite	MW Peakfläche	MW Standard- fehler	MW relativer Standard- fehler [%]
1,2,4-Trihydroxybenzen	16626	1197	7.79
1,3-Diaminopropan	14110	691	4.80
2-Hydroxyglutarat	13566	978	5.20
2-Oxobutanoat	107964	9258	8.43
3-Hydroxybenzoat	934	322	34.48
3-methyl-2-oxobutanoat	14282	2831	19.82
4-Aminobutanoat	7834	2229	31.23
4-Hydroxyphenylacetat	85520	5542	6.14
5'-Methylthioadenosin	38707	3223	9.07
5-Oxoprolin	31507	3126	10.65
Adenin	22966	2265	9.80
Adenosin	29927	3586	8.67
Alanin	120884	5479	5.64
AMP	12751	1977	18.53
Aspartat	4773	750	15.53
Benzoat	26383	1643	6.23
beta-Alanin	2379	281	11.31
Cellobiose	25813	2563	14.40
Citrat	8016	749	9.33
Dihydroxyacetonphosphat	2150	376	17.31
Erythritol	16839	1193	7.18
Fructose	10244	1185	13.04

<b>Metabolite</b>	<b>MW Peakfläche</b>	<b>MW Standard- fehler</b>	<b>MW relativer Standard- fehler [%]</b>
Fructose-6-phosphat	38836	2727	5.07
Fumarat	7890	908	12.22
Galactosamin	9130	878	9.21
Galactose	1328425	85216	6.43
Galacturonat	10112	770	6.25
Gluconat	20566	4164	9.01
Glucosamin	6154	1163	38.03
Glucosamin-6-phosphat	8100	1685	21.62
Glucose	2348271	590256	19.54
Glucose-6-phosphat	20048	1248	5.48
Glucuronat	13279	694	5.22
Glutamat	52492	3209	6.12
Glutamat_methylester	30658	6228	17.61
Glyceraldehyd	2604	1376	51.22
Glycerat	10909	562	5.50
Glycerol	803931	12270	3.81
Glycerol-3-phosphat	1171129	24955	2.08
Glycin	77321	6115	8.43
Homoserin	6722	982	20.19
Homoserin-lacton	7914	584	15.91
Hydroxylamin	11128	2014	23.91
Inositol	32614	1855	7.87
Inositol-1-phosphat	9706	626	6.41
Isoleucin	13922	1883	27.26
KDG	12532	1063	8.98
Lactat	74072	6908	10.46
Lactose	13996	1229	8.79
Lysin	17130	1495	8.84
Malat	5663	363	5.93
Malat_4_methylester	33090	1412	7.04
Malonat	14896	705	16.18
Maltotriose	18933	2518	13.25
Mannitol	14006	653	4.74
Mannose	6615	920	16.64

<b>Metabolite</b>	<b>MW Peakfläche</b>	<b>MW Standard- fehler</b>	<b>MW relativer Standard- fehler [%]</b>
N-Acetylglucosamin	1076	268	24.93
N-Hexanoyl-homoserin-lacton	19150	1733	11.68
Nicotinamid	67478	5701	7.97
O-Acetyl-serin	6090	1495	25.89
Oxalat	14060	1766	12.35
Oxomalonat	11766	424	3.70
Palatinose	10921	1734	15.88
Phenylpyruvat	3542	851	23.61
Prolin	6212	777	16.44
Putrescin	270503	19061	10.27
Pyruvat	19729	2271	15.16
Rhamnose	3865	324	8.35
Ribose	3142	1427	46.61
Serin	17238	1452	15.20
Shikimat	156438	23909	10.99
Spermidin	173219	15953	8.88
Succinat	22544	3181	14.85
Threonin	6158	407	6.28
Thymin	4101	1121	24.85
Trehalose	5675040	335158	7.25
Tyrosin	50041	25071	50.10
Uracil	14798	2352	47.25
Uridin	6216	335	6.89
Valin	61655	4561	8.51
Xylose	11744	4794	44.61
Xylulose	1034028	47018	4.74
Xylulose-5-phosphat	5497	488	8.91

**Tab. 23** Semiquantitative Intensitäten identifizierter Metabolite des Vergleichs zwischen Proben vor und eine Stunde nach einem Kälteschock von 80 °C auf 65 °C.

Metabolite	MW 80°C	Standard- fehler	Relativer Standard- fehler [%]	MW 1 h	Standard- fehler	Relativer Standard- fehler [%]
1,2,4-Trihydroxybenzen	1339684	193188	14.42	1424092	365314	25.65
1,3-Diaminopropan	0	0		0	0	
2-Aminobutanoat	1186382	127719	10.77	791914	396444	50.06
2-Hydroxyglutarat	744734	49497	6.65	923073	121962	13.21
4-Hydroxyphenylacetat	7913160	379875	4.80	7247720	306516	4.23
5'-Methylthioadenosin	466310	221812	47.57	224697	115400	51.36
5-Oxoprolin	1375158	439613	31.97	1976770	563878	28.53
Adenin	3110536	253834	8.16	1787837	73493	4.11
Adenosin	1236253	193928	15.69	1119165	88651	7.92
Alanin	12127676	1198700	9.88	10808293	1818700	16.83
Aspartat	359293	160350	44.63	544007	272544	50.10
Cellobiose	4690162	75581	1.61	4263345	101934	2.39
Citrat	994669	54430	5.47	1264725	273804	21.65
Erythritol	115541	10760	9.31	794332	717080	90.27
Fructose	488128	188773	38.67	620178	141734	22.85
Fructose-6-phosphat	920803	124830	13.56	1432181	120845	8.44
Galactosamin	0	0		0	0	
Galactose	176795762	32909259	18.61	244864693	51413969	21.00
Galacturonat	105021	55178	52.54	334596	126304	37.75
Glucosamin	698547	55451	7.94	700453	110186	15.73
Glucose	107837943	12143643	11.26	148450898	19932806	13.43
Glucose-6-phosphat	800382	127105	15.88	1368435	160960	11.76
Glutamat	2839009	225068	7.93	7700404	318360	4.13
Glutamat_methylester	2180238	115082	5.28	2527583	99050	3.92
Glycerat	1847185	14911	0.81	1417888	163731	11.55
Glycerol	3051234	305159	10.00	9516385	4690437	49.29
Glycerol-3-phosphat	1223209	71936	5.88	1827725	246159	13.47
Glycin	2876246	291813	10.15	2490889	368163	14.78
Homoserin	135213	13324	9.85	174845	130728	74.77
Homoserin-lacton	0	0		0	0	
Inositol	6097818	277404	4.55	9228521	179174	1.94
Inositol-1-phosphat	19205	3400	17.70	40262	5483	13.62
Isoleucin	537807	37786	7.03	513005	88634	17.28



Metabolite	MW 80°C	Standard- fehler	Relativer Standard- fehler [%]	MW 1 h	Standard- fehler	Relativer Standard- fehler [%]
KDG	1091471	565877	51.85	2776861	671193	24.17
Lactat	6210736	1117137	17.99	6661619	1555621	23.35
Lactose	1067733	353581	33.12	363982	54553	14.99
Lysin	2064103	80265	3.89	1765696	80852	4.58
Malonat	3635457	451965	12.43	1253983	234027	18.66
Maltotriose	1057861	339320	32.08	1480630	342343	23.12
Mannitol	1442904	73615	5.10	1256022	23501	1.87
Mannose	522199	274858	52.63	661692	60765	9.18
N-Hexanoyl-homoserin- lacton	1916188	277619	14.49	1419625	141530	9.97
Nicotinamid	2307566	221800	9.61	2036104	331455	16.28
O-Acetyl-serin	493220	144273	29.25	276224	180649	65.40
Putrescin	23722381	525240	2.21	20194890	1547373	7.66
Serin	457864	174055	38.01	309364	131693	42.57
Shikimat	602509	93282	15.48	977853	36622	3.75
Spermidin	8677276	391867	4.52	10569523	513336	4.86
Succinat	2326845	225080	9.67	2928816	723534	24.70
Threonin	327220	19566	5.98	420202	44278	10.54
Tyrosin	0	0		50041	25071	50.10
Unknown#bth-pae-065	287880	30927	10.74	233309	17169	7.36
Unknown-P2-009	0	0		0	0	
Unknown-P2-011	22993	3529	15.35	5224	2648	50.69
Unknown-P2-012	4379	760	17.37	5627	706	12.55
Unknown-P2-015	7044	809	11.48	5974	414	6.92
Unknown-P2-016	2924	1510	51.64	0	0	
Uracil	248941	66428	26.68	318900	61189	19.19
Uridin	0	0		0	0	
Valin	2049473	235308	11.48	1692778	241468	14.26
Xylose	420534	91233	21.69	0	0	
Xylulose	3943419	180524	4.58	4868360	322499	6.62

**Tab. 24** Semiquantitative Intensitäten identifizierter Metabolite des Vergleichs zwischen Proben 23 Stunden nach dem Kälteschock und einer kontinuierlichen 65 °C-Kultur.

Metabolite	MW 23 h	Standard- fehler	Relativer Standard- fehler [%]	MW 65 h	Standard- fehler	Relativer Standard- fehler [%]
1,2,4-Trihydroxybenzen	1511855	261914	17.32	1184324	439216	37.09
1,3-Diaminopropan	0	0		2607820	113757	4.36
2-Aminobutanoat	1139177	128346	11.27	0	0	
2-Hydroxyglutarat	947380	77620	8.19	1284580	68701	5.35
4-Hydroxyphenylacetat	15628427	502287	3.21	0	0	
5'-Methylthioadenosin	4735627	235953	4.98	4840184	576549	11.91
5-Oxoprolin	2796122	492541	17.62	1675995	313014	18.68
Adenin	3983522	213471	5.36	4624130	404582	8.75
Adenosin	1185332	42119	3.55	1307991	88804	6.79
Alanin	19887703	4247168	21.36	14931823	1758606	11.78
Aspartat	264861	149006	56.26	0	0	
Cellobiose	3387451	326711	9.64	3131828	160418	5.12
Citrat	1418639	223038	15.72	1797849	217668	12.11
Erythritol	953486	75550	7.92	6629324	489961	7.39
Fructose	1195714	51917	4.34	1410474	149109	10.57
Fructose-6-phosphat	4315271	129748	3.01	1396407	227343	16.28
Galactosamin	0	0		1963094	40105	2.04
Galactose	154569009	6261157	4.05	159512096	16617798	10.42
Galacturonat	1177248	53906	4.58	1710640	103062	6.02
Glucosamin	751088	38621	5.14	1497168	53051	3.54
Glucose	99777513	6255547	6.27	127968564	7663001	5.99
Glucose-6-phosphat	5106027	239898	4.70	1100016	123921	11.27
Glutamat	6865992	813141	11.84	3707825	151597	4.09
Glutamat_methylester	3006378	54656	1.82	2033447	197144	9.70
Glycerat	2443512	302692	12.39	4804301	898509	18.70
Glycerol	1888098	167026	8.85	10981315	804724	7.33
Glycerol-3-phosphat	1159561	128039	11.04	9566728	728025	7.61
Glycin	3103700	569464	18.35	4676691	405213	8.66
Homoserin	419524	24571	5.86	549031	48537	8.84
Homoserin-lacton	228057	9217	4.04	205638	22383	10.88
Inositol	12564305	465432	3.70	13248064	684219	5.16
Inositol-1-phosphat	35086	1133	3.23	19635	2630	13.40
Isoleucin	932335	127431	13.67	4216749	928358	22.02

Metabolite	MW 23 h	Standard- fehler	Relativer Standard- fehler [%]	MW 65 h	Standard- fehler	Relativer Standard- fehler [%]
KDG	2702866	1135682	42.02	13201046	4568715	34.61
Lactat	7463502	783227	10.49	6861056	1384358	20.18
Lactose	447578	41044	9.17	2476619	1495059	60.37
Lysin	1561197	481212	30.82	3262575	42426	1.30
Malonat	2107982	278484	13.21	3145581	491158	15.61
Maltotriose	1671651	276306	16.53	1314362	574478	43.71
Mannitol	1040629	16877	1.62	1097299	21607	1.97
Mannose	1084813	56393	5.20	1903941	47160	2.48
N-Hexanoyl-homoserin- lacton	1534758	271476	17.69	354352	216733	61.16
Nicotinamid	2706110	269759	9.97	2794276	309525	11.08
O-Acetyl-serin	301814	64049	21.22	197011	67148	34.08
Putrescin	32074127	584782	1.82	21520080	964893	4.48
Serin	1284593	387062	30.13	1495169	218191	14.59
Shikimat	854778	37323	4.37	654491	189327	28.93
Spermidin	6349221	277605	4.37	11526493	97404	0.85
Succinat	2375776	465085	19.58	3060986	430469	14.06
Threonin	312601	13736	4.39	416874	26299	6.31
Tyrosin	180398	7565	4.19	0	0	
Unknown#bth-pae-065	235058	4296	1.83	237885	36486	15.34
Unknown-P2-009	2630	1353	51.45	9702	570	5.88
Unknown-P2-011	12346	436	3.53	9811	1070	10.91
Unknown-P2-012	4274	2139	50.05	7357	1255	17.05
Unknown-P2-015	13559	308	2.27	21070	2211	10.49
Unknown-P2-016	0	0		0	0	
Uracil	333648	41536	12.45	447815	74156	16.56
Uridin	233797	118104	50.52	525626	59310	11.28
Valin	11329502	1843382	16.27	19488488	2583810	13.26
Xylose	0	0		0	0	
Xylulose	6722237	485620	7.22	11020483	845742	7.67

**Tab. 25** Semiquantitative Intensitäten identifizierter Metabolite von P2 1617 bei 70 °C und 80 °C.

Metabolite	MW 80 °C	Standard- fehler	Relativer Standardfehler [%]	MW 70 °C	Standard- fehler	Relativer Standardfehler [%]	Faktor 70 °C/80 °C
1,2,4-Trihydroxybenzen	0	0		17523	4004	22.85	
1,3-Diaminopropan	0	0		16888	893	5.29	
2-Hydroxyglutarat	6179	438	7.09	17786	672	3.78	2.88
4-Aminobutanoat	0	0		2443	192	7.84	
4-Hydroxyphenylacetat	79337	4014	5.06	0	0		
5'-Methylthioadenosin	58134	4963	8.54	47067	2084	4.43	0.81
5-Oxoprolin	16240	2456	15.12	0	0		
Adenin	31790	3044	9.57	26870	1047	3.89	0.85
Adenosin	6925	691	9.98	4561	500	10.95	0.66
Alanin	19143	1187	6.20	61344	3509	5.72	3.20
AMP	11863	4233	35.68	1093	623	57.04	0.09
Aspartat	1804	140	7.78	0	0		
Beta-Alanin	2531	480	18.98	6488	1327	20.45	2.56
Cellobiose	11707	3458	29.54	16798	1883	11.21	1.43
Citrat	4696	716	15.24	4525	184	4.06	0.96
Erythritol	16099	1848	11.48	128115	2146	1.68	7.96
Fructose	8014	2210	27.58	36998	1016	2.75	4.62
Fructose-6-phosphat	94661	7974	8.42	42114	9344	22.19	0.44
Fumarat	7365	617	8.38	7222	2208	30.57	0.98
Galactosamin	8749	840	9.60	25843	2787	10.78	2.95
Galactose	1135147	74104	6.53	1086396	74635	6.87	0.96

Metabolite	MW 80 °C	Standard- fehler	Relativer Standardfehler [%]	MW 70 °C	Standard- fehler	Relativer Standardfehler [%]	Faktor 70 °C/80 °C
Galacturonat	6718	441	6.57	10814	1125	10.40	1.61
Gluconat	37883	4429	11.69	54020	6916	12.80	1.43
Glucosamin	10360	390	3.77	33727	4999	14.82	3.26
Glucosamin-6-phosphat	18451	2702	14.64	8900	557	6.26	0.48
Glucose	6028275	1732301	28.74	2154356	320178	14.86	0.36
Glucose-6-phosphat	27349	1042	3.81	11738	696	5.93	0.43
Glutamat	8629	567	6.57	54165	8199	15.14	6.28
Glutamat_methylester	0	0		15074	6983	46.33	
Glyceraldehyd	4437	2747	61.90	14304	3867	27.04	3.22
Glycerat	5076	333	6.56	12921	1104	8.54	2.55
Glycerol	44958	3930	8.74	47935	3575	7.46	1.07
Glycerol-3-phosphat	1293259	31625	2.45	537366	12953	2.41	0.41
Glycin	65774	9335	14.19	56609	2597	4.59	0.86
Homoserin	4636	652	14.07	4058	718	17.70	0.88
Homoserin-lacton	1045	376	36.00	1505	329	21.83	1.44
Hydroxylamin	23362	1305	5.59	41581	1622	3.90	1.78
Inositol	19210	1392	7.25	73480	1260	1.71	3.83
Inositol-1-phosphat	4919	404	8.20	2049	501	24.44	0.42
Isoleucin	3695	237	6.41	22288	5966	26.77	6.03
KDG	11134	1267	11.38	54515	1411	2.59	4.90
Lactat	46942	6716	14.31	74839	2949	3.94	1.59
Lactose	8527	945	11.08	51283	1511	2.95	6.01

Metabolite	MW 80 °C	Standard- fehler	Relativer Standardfehler [%]	MW 70 °C	Standard- fehler	Relativer Standardfehler [%]	Faktor 70 °C/80 °C
Lysin	7740	1109	14.32	28329	2788	9.84	3.66
Malat	4676	151	3.23	4733	164	3.47	1.01
Malat_4_methylester	1823	182	9.97	1556	140	8.97	0.85
Malonat	0	0		37629	1108	2.94	
Maltotriose	13010	1622	12.47	12199	2355	19.31	0.94
Mannitol	4769	271	5.69	7148	125	1.75	1.50
Mannose	5243	1566	29.87	13666	1108	8.11	2.61
Nicotinamid	75763	10473	13.82	70967	9413	13.26	0.94
O-Acetyl-serin	5873	1328	22.61	3102	1008	32.49	0.53
Oxalat	12014	1308	10.89	14765	1743	11.81	1.23
Prolin	8328	540	6.48	15908	1970	12.38	1.91
Putrescin	315862	42622	13.49	559274	35619	6.37	1.77
Pyruvat	0	0		10744	2489	23.17	
Serin	11747	967	8.23	8918	249	2.79	0.76
Shikimat	13423	1403	10.45	14146	1541	10.89	1.05
Spermidin	69417	4741	6.83	62209	12015	19.31	0.90
Succinat	70970	10257	14.45	72735	8044	11.06	1.02
Threonin	5084	283	5.57	3464	218	6.29	0.68
Trehalose	1864958	105492	5.66	3166157	146145	4.62	1.70
Unknown#bth-pae-056	151512	7312	4.83	79223	6621	8.36	0.52
Unknown#bth-pae-065	11131	722	6.48	21785	654	3.00	1.96
Unknown#sst-cgl-008	98416	25349	25.76	20794	3773	18.15	0.21

Metabolite	MW 80 °C	Standard- fehler	Relativer Standardfehler [%]	MW 70 °C	Standard- fehler	Relativer Standardfehler [%]	Faktor 70 °C/80 °C
Unknown#sst-cgl-046	30854	8619	27.94	8589	2236	26.04	0.28
Unknown-P2-002	5597	1087	19.43	29042	2628	9.05	5.19
Unknown-P2-009	6704	300	4.47	11899	437	3.67	1.78
Unknown-P2-011	24382	690	2.83	8274	1893	22.88	0.34
Unknown-P2-012	8166	635	7.77	29749	792	2.66	3.64
Unknown-P2-016	28844	8527	29.56	7514	467	6.22	0.26
Unknown-P2-113	188905	21137	11.19	203561	10547	5.18	1.08
Unknown-PBL-005	1172	1172	100.00	2044	676	33.08	1.74
Unknown-PBL-022	2193	887	40.44	1007	511	50.80	0.46
Uracil	41834	5521	13.20	30871	6888	22.31	0.74
Valin	63961	4286	6.70	628843	59900	9.53	9.83
Xylose	6156	3236	52.56	0	0		
Xylulose	28296	2195	7.76	76676	1862	2.43	2.71

**Tab. 26** Semiquantitative Intensitäten identifizierter Metabolite von P2 1617 bei 65 °C und 70 °C.

Metabolite	MW 70 °C	Standard- fehler	Relativer Standardfehler [%]	MW 65 °C	Standard- fehler	Relativer Standardfehler [%]	Faktor 65 °C/70 °C
1,2,4-Trihydroxybenzen	5643	1255	22.23	4424	210	4.76	0.78
1,3-Diaminopropan	11331	489	4.32	16991	541	3.18	1.50
2-Hydroxyglutarat	7525	1088	14.46	5266	1077	20.45	0.70
4-Aminobutanoat	32406	5962	18.40	12596	1965	15.60	0.39

Metabolite	MW 70 °C	Standard- fehler	Relativer Standardfehler [%]	MW 65 °C	Standard- fehler	Relativer Standardfehler [%]	Faktor 65 °C/70 °C
5'-Methylthioadenosin	28209	1506	5.34	12630	3715	29.41	0.45
5-Oxoprolin	72434	4686	6.47	22481	9178	40.82	0.31
Adenin	26870	1047	3.90	0	0		
Adenosin	5022	1174	23.38	2587	1095	42.34	0.52
Alanin	147331	5276	3.58	137604	14951	10.87	0.93
AMP	1093	623	57.00	0	0		
Benzoat	0	0		26383	1643	6.23	
beta-Alanin	5113	559	10.93	3146	191	6.06	0.62
Cellobiose	7523	359	4.78	9168	5968	65.09	1.22
Citrat	16304	1765	10.83	2805	346	12.35	0.17
Erythritol	98537	1210	1.23	133005	2272	1.71	1.35
Fructose	10032	1563	15.58	2276	323	14.20	0.23
Fructose-6-phosphat	13496	803	5.95	4426	1642	37.11	0.33
Galactose	296407	47055	15.88	141599	11040	7.80	0.48
Galacturonat	11747	1628	13.86	0	0		
Gluconat	42365	2413	5.70	23556	2776	11.78	0.56
Glucosamin	10568	1199	11.34	8243	1518	18.41	0.78
Glucose	1286132	196198	15.25	817461	82045	10.04	0.64
Glucose-6-phosphat	4420	1738	39.32	3236	1414	43.68	0.73
Glutamat	58491	1852	3.17	68091	3692	5.42	1.16
Glutamat_methylester	16549	2507	15.15	13938	2063	14.80	0.84
Glyceraldehyd	17880	1901	10.63	26008	1066	4.10	1.45



Metabolite	MW 70 °C	Standard- fehler	Relativer Standardfehler [%]	MW 65 °C	Standard- fehler	Relativer Standardfehler [%]	Faktor 65 °C/70 °C
Glycerat	65298	6483	9.93	51122	4842	9.47	0.78
Glycerol	1311785	113649	8.66	2594030	1602495	61.78	1.98
Glycerol-3-phosphat	255816	14539	5.68	164174	13423	8.18	0.64
Glycin	66876	4299	6.43	56004	6976	12.46	0.84
Homoserin	12301	1075	8.74	11870	677	5.70	0.97
Hydroxylamin	21309	2745	12.88	19480	1702	8.74	0.91
Inositol	278744	25660	9.21	281361	62866	22.34	1.01
Inositol-1-phosphat	19426	1720	8.86	15254	676	4.43	0.79
Isoleucin	10070	782	7.76	10182	4383	43.05	1.01
KDG	27988	1204	4.30	23311	1784	7.65	0.83
Lactat	81844	8674	10.60	104784	25968	24.78	1.28
Lactose	47327	1029	2.18	37850	2091	5.52	0.80
Lysin	13776	643	4.66	8486	2781	32.77	0.62
Malat	6649	574	8.63	1283	334	26.00	0.19
Malonat	31832	7774	24.42	24779	10099	40.76	0.78
Mannitol	22110	1409	6.37	14082	592	4.21	0.64
Mannose	482166	55875	11.59	331828	26447	7.97	0.69
Nicotinamid	8420	2683	31.87	2460	1664	67.64	0.29
Oxalat	14378	1576	10.96	23103	5236	22.66	1.61
Prolin	3292	1074	32.62	4667	324	6.94	1.42
Putrescin	247773	7612	3.07	161539	20774	12.86	0.65
Pyruvat	10744	2489	23.17	0	0		

Metabolite	MW 70 °C	Standard- fehler	Relativer Standardfehler [%]	MW 65 °C	Standard- fehler	Relativer Standardfehler [%]	Faktor 65 °C/70 °C
Serin	4010	2088	52.07	3644	2535	69.56	0.91
Shikimat	8549	1694	19.82	8189	108	1.32	0.96
Spermidin	230274	22956	9.97	171748	24639	14.35	0.75
Succinat	64724	942	1.46	61673	6596	10.70	0.95
Threonin	8005	720	8.99	8519	736	8.64	1.06
Trehalose	15688130	232522	1.48	14829674	500225	3.37	0.95
Unknown#bth-cgl-008	38117	5943	15.59	2552	460	18.02	0.07
Unknown#bth-cgl-046	8589	2236	26.03	5777	1072	18.56	0.67
Unknown#bth-pae-056	48581	3050	6.28	34019	4740	13.93	0.70
Unknown#bth-pae-065	37864	2531	6.68	19186	3372	17.57	0.51
Unknown-P2-002	8516	1586	18.63	0	0		
Unknown-P2-009	25929	2771	10.69	4321	934	21.62	0.17
Unknown-P2-011	8274	690	8.34	0	0		
Unknown-P2-012	14444	745	5.16	21875	2591	11.84	1.51
Unknown-P2-016	19897	3313	16.65	8906	1093	12.27	0.45
Unknown-P2-113	487997	74080	15.18	353409	22024	6.23	0.72
Uracil	30842	5100	16.54	12255	7106	57.98	0.40
Valin	255589	5023	1.97	151344	65659	43.38	0.59
Xylulose	78942	1285	1.63	40103	10572	26.36	0.51

**Tab. 27** Semiquantitative Intensitäten identifizierter Metabolite des Vergleichs zwischen Proben vor und nach einem Hitzeschock von 80 °C auf 88 °C.

Metabolite	MW 80 °C	Standard- fehler	Relativer Standardfehler [%]	MW 88 °C	Standard- fehler	Relativer Standardfehler [%]	Faktor 88°C/80°C
1,2,4-Trihydroxybenzen	23813	1531	6.43	25470	1207	4.74	1.07
2-Aminobutanoat	16792	990	5.90	15090	2586	17.14	0.90
2-Hydroxyglutarat	16604	568	3.42	14874	956	6.43	0.90
2-Oxobutanoat	111572	14364	12.87	106250	12162	11.45	0.95
3-Hydroxybenzoat	935	322	34.48	108	80	73.81	0.12
4-Aminobutanoat	1724	238	13.79	11751	1346	11.46	6.81
4-Hydroxyphenylacetat	106175	3788	3.57	78503	3647	4.65	0.74
5'-Methylthioadenosin	25113	1938	7.72	31961	7763	24.29	1.27
5-Oxoprolin	43247	3424	7.92	44352	3256	7.34	1.03
Adenin	11321	855	7.55	14056	1956	13.92	1.24
Adenosin	5790	274	4.73	5553	298	5.36	0.96
Alanin	259982	10526	4.05	215098	23943	11.13	0.83
AMP	12543	741	5.91	22500	2377	10.57	1.79
Aspartat	4768	1268	26.59	3814	1479	38.78	0.80
Cellobiose	44836	2578	5.75	39446	1676	4.25	0.88
Citrat	2425	178	7.33	2627	253	9.62	1.08
Erythritol	13668	618	4.52	8052	647	8.03	0.59
Fructose	9193	545	5.92	10126	944	9.32	1.10
Fructose-6-phosphat	6405	173	2.71	4985	531	10.65	0.78
Fumarat	4518	764	16.90	12490	2872	22.99	2.76
Galactosamin	10545	582	5.52	8580	630	7.34	0.81

Metabolite	MW 80 °C	Standard- fehler	Relativer Standardfehler [%]	MW 88 °C	Standard- fehler	Relativer Standardfehler [%]	Faktor 88°C/80°C
Galactose	1827303	119811	6.56	1746697	88090	5.04	0.96
Galacturonat	11800	819	6.94	10133	1302	12.85	0.86
Gluconat	58713	5776	9.84	66122	5606	8.48	1.13
Glucose	308383	41123	13.33	316508	26010	8.22	1.03
Glucose-6-phosphat	5823	274	4.70	3461	328	9.49	0.59
Glutamat	86742	3833	4.42	90395	11135	12.32	1.04
Glycerat	19069	937	4.91	19194	1911	9.96	1.01
Glycerol-3-phosphat	1101379	24191	2.20	1189267	36813	3.10	1.08
Glycin	72365	1664	2.30	76496	11308	14.78	1.06
Homoserine-lacton	9314	443	4.76	7371	380	5.16	0.79
Hydroxylamin	9504	2874	30.24	15405	3463	22.48	1.62
Inositol	66602	3771	5.66	46900	2898	6.18	0.70
Inositol-1-phosphat	11745	501	4.27	8517	1435	16.85	0.73
Isoleucin	2212	1158	52.36	71738	17284	24.09	32.43
KDG	38569	2521	6.54	36611	2748	7.51	0.95
Lactat	116616	6541	5.61	105055	6139	5.84	0.90
Lactose	16200	1079	6.66	6224	1030	16.54	0.38
Lysin	18552	729	3.93	66833	14506	21.71	3.60
Malonat	5613	467	8.32	4226	270	6.38	0.75
Maltotriose	40822	5524	13.53	35475	4601	12.97	0.87
Mannitol	24866	1258	5.06	13023	586	4.50	0.52
N-Hexanoyl-homoserin-lacton	28146	1712	6.08	23593	1465	6.21	0.84

Metabolite	MW 80 °C	Standard- fehler	Relativer Standardfehler [%]	MW 88 °C	Standard- fehler	Relativer Standardfehler [%]	Faktor 88 °C/80 °C
Nicotinamid	32828	1057	3.22	32483	1820	5.60	0.99
O-Acetyl-serin	8255	1761	21.33	3956	1499	37.90	0.48
Oxomalonat	9601	403	4.20	8446	383	4.54	0.88
Palatinose	18112	4613	25.47	23001	1684	7.32	1.27
Prolin	7016	718	10.23	598	423	70.72	0.09
Putrescin	322224	7736	2.40	63914	5246	8.21	0.20
Serin	5564	2227	40.03	7866	3394	43.15	1.41
Shikimat	7842	798	10.17	8431	577	6.85	1.08
Spermidin	244037	16469	6.75	155064	17924	11.56	0.64
Succinat	10164	668	6.58	10647	1736	16.31	1.05
Threonin	9458	516	5.46	9115	1064	11.68	0.96
Trehalose	6078986	281880	4.64	4769154	98029	2.06	0.78
Unknown#bth-pae-056	74748	2183	2.92	124759	7071	5.67	1.67
Unknown#bth-pae-065	13228	892	6.74	11628	870	7.48	0.88
Unknown#sst-cgl-008	70869	9259	13.07	108140	11567	10.70	1.53
Unknown-P2-002	5138	664	12.92	0	0		
Unknown-P2-009	6624	1223	18.46	0	0		
Unknown-P2-011	11445	1687	14.74	3627	831	22.92	0.32
Unknown-P2-012	2688	237	8.83	3823	254	6.65	1.42
Unknown-P2-016	54493	2802	5.14	46856	2920	6.23	0.86
Uracil	1784	950	53.25	5892	1162	19.72	3.30
Uridin	8258	397	4.81	9999	417	4.17	1.21

Metabolite	MW 80 °C	Standard- fehler	Relativer Standardfehler [%]	MW 88 °C	Standard- fehler	Relativer Standardfehler [%]	Faktor 88 °C/80 °C
Valin	27314	3737	13.68	146492	29379	20.06	5.36
Xylose	17332	6353	36.65	14196	3814	26.86	0.82
Xylulose	86189	1968	2.28	56793	3792	6.68	0.66

**Tab. 28** Semiquantitative Intensitäten identifizierter Metabolite des Vergleichs zwischen P2 1617 und PBL 2025.

Metabolite	MW P2	Standard- fehler	Relativer Standardfehler [%]	MW PBL 2025	Standard- fehler	Relativer Standardfehler [%]	Faktor PBL/P2
1,2,4-Trihydroxybenzen	9439	864	9.15	0	0		
2-Hydroxyglutarat	8292	266	3.21	2317	427	18.42	0.28
2-Oxobutanoat	104356	4152	3.98	103333	4459	4.31	0.99
4-Hydroxyphenylacetat	59061	1770	3.00	77807	7263	9.34	1.32
5'-Methylthioadenosin	47983	2493	5.20	17512	3023	17.26	0.36
5-Oxoprolin	26522	2367	8.93	25156	3191	12.68	0.95
Adenin	10105	1193	11.80	0	0		
Adenosin	7065	502	7.10	4695	254	5.42	0.66
Alanin	130680	2572	1.97	136745	7315	5.35	1.05
AMP	21535	1684	7.82	75155	16900	22.49	3.49
Aspartat	5031	999	19.85	13333	928	6.96	2.65
Cellobiose	20898	1653	7.91	19025	2403	12.63	0.91
Citrat	8639	338	3.91	9988	1138	11.39	1.16
Dihydroxyacetonphosphat	1290	101	7.85	3132	553	17.66	2.43

<b>Metabolite</b>	<b>MW P2</b>	<b>Standard- fehler</b>	<b>Relativer Standardfehler [%]</b>	<b>MW PBL 2025</b>	<b>Standard- fehler</b>	<b>Relativer Standardfehler [%]</b>	<b>Faktor PBL/P2</b>
Erythritol	21868	1096	5.01	0	0		
Fructose	13735	420	3.06	20702	1220	5.89	1.51
Fructose-6-phosphat	30267	1654	5.46	91617	5634	6.15	3.03
Fumarat	0	0		8324	1411	16.95	
Galactosamin	5351	402	7.52	5538	597	10.78	1.04
Galactose	1106654	82930	7.49	492296	89212	18.12	0.44
Galacturonat	1743	47	2.69	2394	133	5.55	1.37
Gluconat	20566	1653	8.04	14541	887	6.10	0.71
Glucose	1203112	150755	12.53	1651390	52149	3.16	1.37
Glucose-6-phosphat	25102	1993	7.94	115484	10493	9.09	4.60
Glucuronat	0	0		13279	694	5.22	
Glutamat	47676	1441	3.02	78512	10333	13.16	1.65
Glutamat_methylester	0	0		10585	1426	13.47	
Glyceraldehyd	1346	948	70.39	5148	2427	47.15	3.82
Glycerat	5849	344	5.88	4380	564	12.89	0.75
Glycerol	1113255	5439	0.49	1285254	148628	11.56	1.15
Glycerol-3-phosphat	996620	12380	1.24	545934	34362	6.29	0.55
Glycin	107423	6127	5.70	90000	5831	6.48	0.84
Homoserin	3231	1220	37.75	4184	2359	56.38	1.29
Homoserin-lacton	13382	932	6.97	7527	1952	25.93	0.56
Hydroxylamin	7930	3110	39.21	11878	2601	21.90	1.50
Inositol	25433	865	3.40	67124	1256	1.87	2.64

<b>Metabolite</b>	<b>MW P2</b>	<b>Standard- fehler</b>	<b>Relativer Standardfehler [%]</b>	<b>MW PBL 2025</b>	<b>Standard- fehler</b>	<b>Relativer Standardfehler [%]</b>	<b>Faktor PBL/P2</b>
Inositol-1-phosphat	8133	342	4.20	19775	2279	11.53	2.43
Isoleucin	4752	1946	40.95	12587	1094	8.69	2.65
KDG	15166	640	4.22	8359	835	9.99	0.55
Lactat	68275	4324	6.33	111943	4489	4.01	1.64
Lactose	19166	2131	11.12	1387899	40918	2.95	72.41
Lysin	12710	685	5.39	10433	559	5.36	0.82
Malat	0	0		5921	415	7.01	
Malat_4_methylester	64356	2641	4.10	12408	1392	11.22	0.19
Mannitol	12383	430	3.47	0	0		
Mannose	7987	273	3.42	13849	670	4.84	1.73
N-Hexanoyl-homoserin-lacton	10155	1755	17.28	3657	1218	33.30	0.36
Nicotinamid	93842	1929	2.06	120694	9168	7.60	1.29
O-Acetyl-serin	4141	1397	33.74	4334	2024	46.69	1.05
Oxomalonat	13931	445	3.19	0	0		
Palatinose	0	0		10921	1734	15.88	
Phenylpyruvat	0	0		2935	622	21.19	
Putrescin	209378	4132	1.97	157847	13000	8.24	0.75
Rhamnose	0	0		3510	281	8.02	
Serin	35629	1108	3.11	30169	2702	8.95	0.85
Shikimat	1977	156	7.87	2833	607	21.42	1.43
Spermidin	155927	14890	9.55	89549	13621	15.21	0.57
Succinat	4038	507	12.55	4816	572	11.88	1.19



Metabolite	MW P2	Standard- fehler	Relativer Standardfehler [%]	MW PBL 2025	Standard- fehler	Relativer Standardfehler [%]	Faktor PBL/P2
Threonin	2083	106	5.11	2626	108	4.12	1.26
Trehalose	11803411	535249	4.53	16468640	1171130	7.11	1.40
Unknown#bth-pae-056	124538	3032	2.43	105771	8151	7.71	0.85
Unknown#bth-pae-065	15774	441	2.80	17389	932	5.36	1.10
Unknown#sst-cgl-008	160724	23113	14.38	386773	79783	20.63	2.41
Unknown#sst-cgl-046	29619	2820	9.52	18026	1226	6.80	0.61
Unknown-P2-002	10980	768	7.00	6296	377	5.99	0.57
Unknown-P2-009	7876	299	3.79	5883	343	5.83	0.75
Unknown-P2-011	23361	943	4.04	43080	1758	4.08	1.84
Unknown-P2-012	28720	1631	5.68	34159	1245	3.64	1.19
Unknown-P2-016	49404	2257	4.57	41731	1569	3.76	0.84
Unknown-PBL-002	0	0		17611	1495	8.49	
Unknown-PBL-005	0	0		3442	379	11.02	
Unknown-PBL-025	0	0		14745	2976	20.18	
Uracil	777	585	75.30	0	0		1.47
Uridin	7226	191	2.64	9189	889	9.68	1.27
Valine	89124	4590	5.15	41044	2775	6.76	0.46
Xylulose	78207	3387	4.33	52666	1807	3.43	0.67
Xylulose-5-phosphat	4160	376	9.04	6834	600	8.77	1.64

**Tab. 29** Semiquantitative Intensitäten identifizierter Metabolite des Vergleichs zwischen PBL 2025 und PBL 2025ΔSSO3195 (MT).

Metabolite	MW PBL 2025	Standard- fehler	Relativer Standardfehler [%]	MW PBL 2025 MT	Standard- fehler	Relativer Standardfehler [%]	Faktor MT/PBL 2025
2-Hydroxyglutarat	2317	427	18.42	16526	866	5.24	7.13
2-Oxobutanoat	103333	4459	4.31	92898	12917	13.90	0.90
4-Hydroxyphenylacetat	77807	7263	9.34	57795	2191	3.79	0.74
5'-Methylthioadenosin	17512	3023	17.26	116880	6822	5.84	6.67
5-Oxoprolin	25156	3191	12.68	35819	4024	11.23	1.42
Adenin	0	0		32652	3999	12.25	
Adenosin	4695	254	5.42	7694	452	5.88	1.64
Alanin	136745	7315	5.35	201513	6645	3.30	1.47
AMP	75155	16900	22.49	49480	2641	5.34	0.66
Aspartat	13333	928	6.96	8339	357	4.29	0.63
Cellobiose	19025	2403	12.63	20938	1619	7.73	1.10
Citrat	9988	1138	11.39	11609	701	6.04	1.16
Dihydroxyacetonphosphat	3132	553	17.66	2041	264	12.94	0.65
Fructose	20702	1220	5.89	12061	1168	9.69	0.58
Fructose-6-phosphat	91617	5634	6.15	35721	829	2.32	0.39
Fumarat	8324	1411	16.95	5578	813	14.58	0.67
Galactosamin	5538	597	10.78	10410	546	5.24	1.88
Galactose	492296	89212	18.12	968798	108325	11.18	1.97
Galacturonat	2394	133	5.55	1397	55	3.92	0.58
Gluconat	14541	887	6.10	15782	1075	6.81	1.09
Glucose	1651390	52149	3.16	2548890	389497	15.28	1.54

<b>Metabolite</b>	<b>MW PBL 2025</b>	<b>Standard- fehler</b>	<b>Relativer Standardfehler [%]</b>	<b>MW PBL 2025 MT</b>	<b>Standard- fehler</b>	<b>Relativer Standardfehler [%]</b>	<b>Faktor MT/PBL 2025</b>
Glucose-6-phosphat	115484	10493	9.09	34116	1286	3.77	0.30
Glucuronat	13279	694	5.22	10431	790	7.57	0.79
Glutamat	78512	10333	13.16	83091	3417	4.11	1.06
Glutamat_methylester	10585	1426	13.47	22621	1859	8.22	2.14
Glyceraldehyd	5148	2427	47.15	30867	2107	6.83	6.00
Glycerat	4380	564	12.89	12743	812	6.37	2.91
Glycerol	1285254	148628	11.56	1373488	83194	6.06	1.07
Glycerol-3-phosphat	545934	34362	6.29	526026	15386	2.92	0.96
Glycin	90000	5831	6.48	128941	9636	7.47	1.43
Homoserin	4184	2359	56.38	9789	1418	14.48	2.34
Homoserin-lacton	7527	1952	25.93	0	0		
Hydroxylamin	11878	2601	21.90	13970	3865	27.67	1.18
Inositol	67124	1256	1.87	91538	4145	4.53	1.36
Inositol-1-phosphat	19775	2279	11.53	27476	1159	4.22	1.39
Isoleucin	12587	1094	8.69	8933	1311	14.68	0.71
KDG	8359	835	9.99	273314	10937	4.00	32.70
Lactat	111943	4489	4.01	97495	3619	3.71	0.87
Lactose	1387899	40918	2.95	790960	15276	1.93	0.57
Lysin	10433	559	5.36	11236	609	5.42	1.08
Malat	5921	415	7.01	5187	392	7.57	0.88
Malat_4_methylester	12408	1392	11.22	16684	1000	5.99	1.34
Mannose	13849	670	4.84	5570	468	8.39	0.40

Metabolite	MW PBL 2025	Standard- fehler	Relativer Standardfehler [%]	MW PBL 2025 MT	Standard- fehler	Relativer Standardfehler [%]	Faktor MT/PBL 2025
N-Hexanoyl-homoserin-lacton	3657	1218	33.30	5341	1885	35.29	1.46
Nicotinamid	120694	9168	7.60	133135	4271	3.21	1.10
O-Acetyl-serin	4334	2024	46.69	6161	1575	25.57	1.42
Palatinose	10921	1734	15.88	0	0		
Phenylpyruvat	2935	622	21.19	6256	208	3.32	2.13
Putrescin	157847	13000	8.24	163878	5781	3.53	1.04
Pyruvat	0	0		32580	1401	4.30	
Rhamnose	3510	281	8.02	4219	366	8.68	1.20
Serin	30169	2702	8.95	34528	1500	4.34	1.14
Shikimat	2833	607	21.42	2704	136	5.01	0.95
Spermidin	89549	13621	15.21	154577	11823	7.65	1.73
Succinat	4816	572	11.88	6678	795	11.91	1.39
Threonin	2626	108	4.12	3689	233	6.31	1.40
Trehalose	16468640	1171130	7.11	7389652	948300	12.83	0.45
Unknown#bth-pae-056	105771	8151	7.71	88854	3547	3.99	0.84
Unknown#bth-pae-065	17389	932	5.36	21619	754	3.49	1.24
Unknown#sst-cgl-008	386773	79783	20.63	305832	24142	7.89	0.79
Unknown#sst-cgl-046	18026	1226	6.80	23532	2276	9.67	1.31
Unknown-P2-002	6296	377	5.99	177242	5091	2.87	28.15
Unknown-P2-009	5883	343	5.83	7101	273	3.85	1.21
Unknown-P2-011	43080	1758	4.08	44035	1792	4.07	1.02
Unknown-P2-012	34159	1245	3.64	19774	572	2.89	0.58

Metabolite	MW PBL 2025	Standard- fehler	Relativer Standardfehler [%]	MW PBL 2025 MT	Standard- fehler	Relativer Standardfehler [%]	Faktor MT/PBL 2025
Unknown-P2-016	41731	1569	3.76	47739	1225	2.57	1.14
Unknown-PBL-002	17611	1495	8.49	39677	2222	5.60	2.25
Unknown-PBL-005	3442	379	11.02	20329	689	3.39	5.91
Unknown-PBL-022	0	0		290958	20343	6.99	
Unknown-PBL-025	14745	2976	20.18	0	0		
Uracil	0	0		3829	1362	35.57	3.36
Uridin	9189	889	9.68	7577	213	2.81	0.82
Valine	41044	2775	6.76	27486	2028	7.38	0.67
Xylulose	52666	1807	3.43	25989	1207	4.64	0.49
Xylulose-5-phosphat	6834	600	8.77	5293	197	3.72	0.77

**Tab. 30** Semiquantitative Intensitäten identifizierter Metabolite von PBL 2025 bei 70 °C und 80 °C.

Metabolite	PBL 2025 MW 80 °C	Standard- fehler	Relativer Standardfehler [%]	PBL 2025 MW 70 °C	Standard- fehler	Relativer Standardfehler [%]	Faktor 70 °C/80 °C
1,2,4-Trihydroxybenzen	0	0		4284	1908	44.54	
2-Hydroxyglutarat	1986	529	26.63	5495	641	11.66	2.77
3-Methyl-2-oxobutanoat	0	0		14282	2831	19.82	
4-Aminobutanoat	0	0		2682	610	22.76	
4-Hydroxyphenylacetat	117961	25031	21.22	42718	5346	12.52	0.36
5'-Methylthioadenosin	63958	5873	9.18	98374	4071	4.14	1.54
5-Oxoprolin	22527	5074	22.52	27836	3874	13.92	1.24

Metabolite	PBL 2025 MW 80 °C	Standard- fehler	Relativer Standardfehler [%]	PBL 2025 MW 70 °C	Standard- fehler	Relativer Standardfehler [%]	Faktor 70 °C/80 °C
Adenin	27564	2582	9.37	30265	1135	3.75	1.10
Adenosin	7927	426	5.37	6002	290	4.83	0.76
Alanin	93103	4340	4.66	94312	8646	9.17	1.01
AMP	34692	4033	11.63	17632	4713	26.73	0.51
Aspartat	15001	1085	7.23	6368	946	14.86	0.42
Cellobiose	17850	1628	9.12	21258	2044	9.61	1.19
Citrat	6313	585	9.27	4178	459	11.00	0.66
Fructose	22506	1366	6.07	231542	10713	4.63	10.29
Fructose-6-phosphat	9389	783	8.34	10964	792	7.22	1.17
Galactosamin	4582	1085	23.67	17711	1422	8.03	3.86
Galactose	805906	227157	28.19	1727506	218110	12.63	2.14
Galacturonat	8364	595	7.12	6089	326	5.35	0.73
Gluconat	21583	1471	6.82	27326	2313	8.46	1.27
Glucosamin	1741	1127	64.71	3130	2154	68.81	1.80
Glucose	7664283	2134793	27.85	7463292	530473	7.11	0.97
Glucose-6-phosphat	19847	1605	8.09	26491	1940	7.32	1.33
Glutamat	64472	9491	14.72	69303	12275	17.71	1.07
Glutamat_methylester	38792	3271	8.43	31241	4852	15.53	0.81
Glycerat	3637	208	5.71	6943	526	7.57	1.91
Glycerol-3-phosphat	127563	5808	4.55	32460	6353	19.57	0.25
Glycin	71806	5157	7.18	31543	2050	6.50	0.44
Homoserin	1446	517	35.73	5188	802	15.45	3.59

<b>Metabolite</b>	<b>PBL 2025 MW 80 °C</b>	<b>Standard- fehler</b>	<b>Relativer Standardfehler [%]</b>	<b>PBL 2025 MW 70 °C</b>	<b>Standard- fehler</b>	<b>Relativer Standardfehler [%]</b>	<b>Faktor 70 °C/80 °C</b>
Homoserin-lacton	0	0		3750	243	6.49	
Hydroxylamin	7436	1051	14.14	2512	1461	58.16	0.34
Inositol	27815	1082	3.89	35420	1624	4.59	1.27
Inositol-1-phosphat	11942	556	4.65	9932	1111	11.19	0.83
Isoleucin	17534	1771	10.10	59140	4270	7.22	3.37
KDG	4296	1228	28.59	17872	1615	9.03	4.16
Lactat	164322	3898	2.37	143469	4996	3.48	0.87
Lactose	2019332	101079	5.01	1526864	220980	14.47	0.76
Lysin	11136	1465	13.15	27037	3813	14.10	2.43
Malat	5443	695	12.77	6116	740	12.09	1.12
Malat_4_methylester	1583	344	21.75	0	0		
Malonat	3929	2525	64.28	5593	2273	40.65	1.42
Maltotriose	16356	1428	8.73	20873	4039	19.35	1.28
Mannitol	0	0		9473	296	3.13	4.36
Mannose	10465	435	4.16	68414	2968	4.34	6.54
Mannose-6-phosphat	12897	992	7.69	12302	658	5.35	0.95
Nicotinamid	4315	195	4.53	2118	129	6.09	0.49
O-Acetyl-serin	4009	2128	53.07	3867	1083	28.00	0.96
Oxalat	16105	2223	13.81	16044	1244	7.75	1.00
Prolin	5905	2144	36.31	8670	3487	40.21	1.47
Putrescin	224066	15360	6.85	470554	36836	7.83	2.10
Pyruvat				25788	6885	26.69	

<b>Metabolite</b>	<b>PBL 2025 MW 80 °C</b>	<b>Standard- fehler</b>	<b>Relativer Standardfehler [%]</b>	<b>PBL 2025 MW 70 °C</b>	<b>Standard- fehler</b>	<b>Relativer Standardfehler [%]</b>	<b>Faktor 70 °C/80 °C</b>
Ribose	3563	1342	37.66	4236	767	18.10	1.19
Serin	19278	2179	11.30	22534	1070	4.75	1.17
Shikimat	40251	2002	4.97	25804	4871	18.87	0.64
Spermidin	51042	6820	13.36	51904	7593	14.63	1.02
Succinat	29235	1268	4.34	4444	297	6.69	0.15
Threonin	8591	781	9.09	6515	277	4.25	0.76
Trehalose	16468640	1171130	7.11	4608902	1144071	24.82	0.28
Tyrosin	25349	2648	10.45	0	0		
Unknown#bth-pae-056	147712	6632	4.49	217279	8729	4.02	1.47
Unknown#bth-pae-065	15966	912	5.71	11112	199	1.79	0.70
Unknown#sst-cgl-008	515428	66597	12.92	276856	36124	13.05	0.54
Unknown-P2-002	12679	2219	17.50	11380	1571	13.81	0.90
Unknown-P2-009	4726	362	7.66	3900	161	4.13	0.83
Unknown-P2-011	54214	2004	3.70	1939	168	8.68	0.04
Unknown-P2-012	13792	548	3.98	183497	19113	10.42	13.30
Unknown-P2-113	156512	24348	15.56	169922	14339	8.44	1.09
Unknown-P2-016	15163	1532	10.10	4515	864	19.14	0.30
Unknown-PBL-002	7113	238	3.35	795	223	28.01	0.11
Unknown-PBL-005	2667	222	8.32	815	419	51.44	0.31
Unknown-PBL-022	8948	1954	21.84	1939	666	34.37	0.22
Uracil	37305	4371	11.72	40669	5008	12.31	1.09
Valin	39099	3150	8.06	462475	46405	10.03	11.83



Metabolite	PBL 2025 MW 80 °C	Standard- fehler	Relativer Standardfehler [%]	PBL 2025 MW 70 °C	Standard- fehler	Relativer Standardfehler [%]	Faktor 70 °C/80 °C
Xylose	1780	1159	65.11	4422	1200	27.15	2.48
Xylulose	20343	1501	7.38	58930	2279	3.87	2.90

**Tab. 31** Semiquantitative Intensitäten identifizierter Metabolite von PBL 2025ΔSSO3195 (MT) bei 70 °C und 80 °C.

Metabolite	PBL MT MW 80 °C	Standard- fehler	Relativer Standardfehler [%]	PBL MT MW 70 °C	Standard- fehler	Relativer Standardfehler [%]	Faktor 70 °C/80 °C
2-Hydroxyglutarat	15304	480	3.14	11739	1099	9.36	0.77
4-Hydroxyphenylacetat	41468	1146	2.76	16089	1672	10.39	0.39
5'-Methylthioadenosin	66224	14172	21.40	168381	8666	5.15	2.54
5-Oxoprolin	27377	2494	9.11	34742	8453	24.33	1.27
Adenin	39283	6306	16.05	44245	2840	6.42	1.13
Adenosin	6360	559	8.80	6440	552	8.57	1.01
Alanin	115725	3912	3.38	207652	26964	12.99	1.79
AMP	17282	3441	19.91	13043	1874	14.37	0.63
Aspartat	2165	872	40.26	8257	1099	13.31	3.81
Cellobiose	8931	3392	37.98	18948	1737	9.17	2.12
Citrat	7437	469	6.31	10972	763	6.95	1.48
Fructose	11067	1188	10.74	6713	3011	44.85	0.61
Fructose-6-phosphat	4371	314	7.18	2634	149	5.66	0.60
Galactosamin	6337	491	7.75	17779	2216	12.47	2.81
Galactose	1293497	363426	28.10	2965854	432065	14.57	2.29

<b>Metabolite</b>	<b>PBL MT MW 80 °C</b>	<b>Standard- fehler</b>	<b>Relativer Standardfehler [%]</b>	<b>PBL MT MW 70 °C</b>	<b>Standard- fehler</b>	<b>Relativer Standardfehler [%]</b>	<b>Faktor 70 °C/80 °C</b>
Galacturonat	3747	222	5.93	3051	64	2.08	0.81
Gluconat	40250	5442	13.52	31489	2942	9.34	0.78
Glucosamin-6-phosphat	0	0		4611	1084	23.51	
Glucose	9455254	2537046	26.83	1169369	172658	14.77	0.12
Glucose-6-phosphat	9391	791	8.43	4713	382	8.11	0.50
Glutamat	36520	7439	20.37	106400	26479	24.89	2.91
Glutamat_methylester	23167	5097	22.00	47057	6053	12.86	2.03
Glyceraldehyd	11141	1786	16.03	27179	861	3.17	2.44
Glycerat	16983	3605	21.23	16304	3908	23.97	0.96
Glycerol-3-phosphat	483541	15818	3.27	81983	2440	2.98	0.17
Glycin	63586	7194	11.31	44175	2551	5.77	0.69
Homoserin	1754	470	26.80	7060	571	8.09	4.02
Homoserin-lacton	0	0		5327	256	4.81	
Hydroxylamin	6793	1030	15.16	8641	1767	20.45	1.27
Inositol	47092	1081	2.29	31393	867	2.76	0.67
Inositol-1-phosphat	16120	1094	6.78	9873	1062	10.76	0.61
Isoleucin	2608	1608	61.67	23864	2416	10.12	6.75
KDG	186766	4885	2.62	393904	51530	13.08	2.11
Lactat	92969	13306	14.31	143560	14432	10.05	1.54
Lactose	552901	59011	10.67	1288087	27029	2.10	2.33
Lysin	6631	452	6.82	16533	1367	8.27	2.49
Malat	3540	566	15.99	6051	691	11.43	1.71

Metabolite	PBL MT MW 80 °C	Standard- fehler	Relativer Standardfehler [%]	PBL MT MW 70 °C	Standard- fehler	Relativer Standardfehler [%]	Faktor 70 °C/80 °C
Malat_4_methylester	7220	442	6.12	12976	889	6.85	1.80
Malonat	0	0		4248	1986	46.75	
Maltotriose	17173	1603	9.33	16744	2465	14.72	0.98
Mannitol	0	0		37838	14226	37.60	
Mannose	10718	1289	12.02	678	335	49.45	0.06
Mannose-6-phosphat	6341	2028	31.98	5589	2250	40.26	0.88
Nicotinamid	3440	258	7.51	2819	231	8.19	0.82
O-Acetyl-serin	3930	1654	42.08	2283	897	39.28	0.58
Oxalat	12629	1501	11.89	13324	1242	9.32	1.06
Prolin	2089	435	20.84	20694	2916	14.09	9.91
Putrescin	219836	21167	9.63	83793	9511	11.35	0.38
Pyruvat	18738	4236	22.61	25891	1761	6.80	1.38
Ribose	2721	1512	55.55	2915	261	8.96	1.07
Serin	11881	2110	17.76	2522	2522	100.00	0.21
Shikimat	25238	5084	20.14	21965	1323	6.02	0.87
Spermidin	58906	5884	9.99	49806	6306	12.66	0.85
Succinat	30859	743	2.38	46792	2018	4.31	1.52
Threonin	5622	548	9.75	8287	423	5.10	1.47
Trehalose	7389652	948300	12.83	16845178	864560	5.13	2.28
Unknown#bth-pae-056	118548	3766	3.18	61052	3957	6.48	0.51
Unknown#bth-pae-065	18181	747	4.11	20342	1147	5.64	1.12
Unknown#sst-cgl-008	176327	48870	27.72	174785	27592	15.79	0.99

<b>Metabolite</b>	<b>PBL MT MW 80 °C</b>	<b>Standard- fehler</b>	<b>Relativer Standardfehler [%]</b>	<b>PBL MT MW 70 °C</b>	<b>Standard- fehler</b>	<b>Relativer Standardfehler [%]</b>	<b>Faktor 70 °C/80 °C</b>
Unknown-P2-002	127844	8640	6.76	336605	23262	6.91	2.63
Unknown-P2-009	6097	219	3.58	3344	201	6.02	0.55
Unknown-P2-011	51174	1195	2.34	76070	3611	4.75	1.49
Unknown-P2-012	5841	361	6.19	11665	670	5.75	2.00
Unknown-P2-016	27595	13716	49.70	11600	1166	10.05	0.42
Unknown-P2-113	119853	9521	7.94	252187	27298	10.82	2.10
Unknown-PBL-002	33937	6776	19.97	6461	773	11.96	0.19
Unknown-PBL-005	18535	1334	7.20	22210	1408	6.34	1.20
Unknown-PBL-022	357181	7718	2.16	440169	55630	12.64	1.23
Uracil	49627	4147	8.36	35777	5886	16.45	0.72
Valin	14308	1853	12.95	42813	2782	6.50	2.99
Xylose	11660	5432	46.59	1126	960	85.23	0.10
Xylulose	3097	935	22.82	7532	684	9.09	2.20

## 9 Abkürzungen

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
°C	Grad Celsius
2D	Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Abb.	Abbildung
ABC	<i>atp binding cassette</i>
AMDIS	<i>Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System</i>
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BHI	<i>Brain heart infusion</i>
bp	Basenpaare
BPG	Bisphosphoglycerat
BRENDA	Braunschweiger Enzymdatenbank ( <i>Braunschweig enzyme database</i> )
BTM	Biotrockenmasse
bzw.	beziehungsweise
<i>c</i>	Konzentration
C	<i>Carbon</i> , Kohlenstoff
<i>C. glutamicum</i>	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
CE	Kapillarelektrophorese ( <i>Capillary electrophoresis</i> )
CI	Chemische Ionisation
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CoA	Koenzym A
DB-5MS	Chromatographiesäule, <i>Fused silica</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSM Z	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ED	Entner-Doudoroff
EI	Elektronenionisation
EMP	Emden-Meyerhof-Parnas
EPS	Exopolysaccharide
ESI	Elektronenspray Ionisation

## Abkürzungen

---

et al.	Et alii (lat.) = und andere
eV	Elektronenvolt
fer	Ferredoxin
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GAP	Glyceraldehyd-3-phosphat
GAPDH	klassische phosphorylierende GAP-Dehydrogenase
GAPN	nicht-phosphorylierende NAD(P) <sup>+</sup> -abhängige GAP-Dehydrogenase
GAPOR	Ferredoxin-abhängige Glyceraldehyd-3-phosphat-Oxidoreduktase
GC	Gaschromatographie
GDH	Glucosedehydrogenase
h	Stunde
H <sub>2</sub> O bidest.	Bidestilliertes Wasser
HCL	Hierarchische Clusteranalyse
HPLC	Flüssigchromatographie ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
Kap.	Kapitel
KDG	2-Keto-3-deoxygluconat
KDPG	2-Keto-3-deoxy-(6-phospho)-gluconat
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
L	Liter
LC	Flüssigchromatographie ( <i>Liquid-Chromatography</i> )
ln	Natürlicher Logarithmus ( <i>logarithmus naturalis</i> )
m/z	Masse zu Ladung
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation</i>
MFCSwin	Software für Bioprozesskontrollen und Datenaufzeichnung
mg	Milligramm
Min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	Messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
MS-MS	Tandem Massenspektrometrie
MSTFA	N-Methyl-N-tri-methylsilyltrifluoracetamid
MT	Mutante

---

NADH	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADP <sup>+</sup>	phosphoryliertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Reduziertes phosphoryliertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
nm	Nanometer
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OD	Optische Dichte
ox	oxidiert
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. furiosus</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
<i>P. putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PEP	Phosphoenolpyruvat
PGK	Phosphoglyceratkinase
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
PPP	Pentosephosphatweg
PTS	Phosphotransferase-System
PTV	Programmed temperature vaporizer
Q	Quadrupol
R <sup>2</sup>	Korrelationskoeffizient
red	reduziert
RI	Retentionsindex
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rotations per minute
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Retentionszeit
RuMP	umgekehrter Ribulosemonophosphatweg
S	Svedberg, Einheit der rRNA
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. solfataricus</i>	<i>Sulfolobus solfataricus</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SulfoSys	<i>Sulfolobus-systems-biology</i>

## Abkürzungen

---

SysMO	<i>Systems Biology of Microorganisms</i>
<i>T. tenax</i>	<i>Thermoproteus tenax</i>
<i>T. thermophilus</i>	<i>Thermus thermophilus</i>
Tab.	Tabelle
TCA	Zitronensäurezyklus
$t_d$	Verdopplungszeit / Generationszeit
TIC	<i>Total ion current</i>
TMS	Trimethylsilyl-Gruppe
TOF	<i>Time of flight</i>
tRNA	transfer-RNA
UDP	Uridindiphosphat
z.B.	zum Beispiel
$\Delta$	Delta, <i>knock out</i> , <i>Differenz</i>
$\mu$	spezifische Wachstumsrate
$\mu\text{L}$	Mikroliter
$\mu\text{m}$	Mikrometer
UV	ultraviolett
WT	Wildtyp



# Danksagung

Bedanken möchte ich mich an erster Stelle bei meinem Mentor Herrn Prof. Dr. Dietmar Schomburg für die Möglichkeit, die Arbeitsgruppe beim Umzug von Köln nach Braunschweig begleiten zu können, an einem spannenden neuen Thema zu arbeiten und viele wertvolle Erfahrungen zu sammeln – und nicht zu vergessen für viele hilfreiche Anregungen und Gespräche.

Prof. Dr. Dieter Jahn danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie Dr. Max Schobert für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Mein besonderer Dank geht an Dr. Kerstin Schreiber für die Unterstützung und Hilfsbereitschaft während meiner gesamten Doktorarbeit, besonders für die zahlreichen Korrekturen und Ratschläge.

Weiterhin möchte ich mich bei Susanne Wachendorf, Carolin Nienhagen, Judith Mönch-Tegeder sowie Thomas Ulas ganz herzlich bedanken, die zeitweise mit mir an diesem anspruchsvollen Projekt gearbeitet und sehr zum Vorankommen meiner Arbeit beigetragen haben. Danken möchte ich auch Jana Spura, Christian Jäger und Dr. Christian Scherling für viele voranbringende Diskussionen, Kritik und Hilfestellungen. Lorenz Reimer und Christian Jäger möchte ich außerdem für viele schöne Abende und Aufmunterungen während meiner Anfangszeit in Braunschweig danken. Der ganzen Arbeitsgruppe Schomburg danke ich für die gute Zusammenarbeit, Unterstützung und die nette Atmosphäre.

Mein großer Dank gebührt auch meinen Kooperationspartnern, ganz besonders Theresa Kouril, Patrick Haferkamp, Julia Reimann, Pawel Sierocinski, Dr. Melanie Zaparty, Dr. Sonja-Verena Albers und Prof. Dr. Bettina Siebers für die gute Zusammenarbeit, zahlreiche Hilfestellungen, Ratschläge, und besonders für die nette Atmosphäre und schöne Zeit während der Meetings. Herzlich bedanken möchte ich mich bei Dr. Sonja-Verena Albers für die Bereitstellung des PBL-Stammes und der *knock out* Mutante sowie bei der AG Siebers für die mittels Enzym *assays* hergestellten Metabolit-Standards.

Zuletzt möchte ich meiner Familie für die Unterstützung während der letzten Jahre meinen Dank aussprechen, vor allem für die Motivation zum Neuanfang und dass sie immer an mich geglaubt haben. Ganz besonders danke ich meiner Schwester Cornelia, die trotz Entfernung immer ein offenes Ohr für meine Sorgen und Nöte hatte, sowie auch für die große Hilfe bei der Korrektur.

Bei André möchte ich mich für seine Geduld und die seelische Unterstützung, besonders während des letzten halben Jahres, von ganzem Herzen bedanken.